

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 401 031**

51 Int. Cl.:

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 33/08 (2006.01)

A61K 33/32 (2006.01)

B01D 15/10 (2006.01)

B01D 15/20 (2006.01)

B01D 15/22 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.09.2007 E 07808800 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.12.2012 EP 2068895**

54 Título: **Modulación de quimiocinas selectiva**

30 Prioridad:

12.09.2006 US 843760 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

16.04.2013

73 Titular/es:

PROPHY MED AB (100.0%)

BOX 81

260 40 VIKEN, SE

72 Inventor/es:

BRUCE, LARS y

LYNGSTADAAS, STAALÉ PETER

74 Agente/Representante:

ES 2 401 031 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Modulación de quimiocinas selectiva.

5 Campo técnico

La presente invención se refiere generalmente a la modulación selectiva de la quimiocina IP-10 y al tratamiento o prevención de enfermedades y estados patógenos caracterizados por expresión de IP-10 adversa.

10 Antecedentes

15 Las citocinas son un grupo de compuestos de señalización proteínicos que se usan de manera extensa para la comunicación intercelular. Estos compuestos son críticos para el funcionamiento de las respuestas inmunitarias tanto innata como adaptativa. Aparte de su importancia en el desarrollo y el funcionamiento del sistema inmunitario, las citocinas desempeñan un papel principal en una variedad de enfermedades inmunológicas, inflamatorias e infecciosas.

20 Las citocinas se producen por una amplia variedad de tipos de células (tanto hematopoyéticas como no hematopoyéticas) y pueden tener efectos tanto sobre células cercanas como por todo el organismo, algunas veces fuertemente dependientes de la presencia de otros compuestos químicos y citocinas.

25 Cada citocina se une generalmente a un receptor de superficie celular específico. Cascadas posteriores de señalización intracelular alteran entonces funciones celulares. Esto puede incluir la regulación por incremento y/o la regulación por disminución de varios genes y sus factores de transcripción, que a su vez dan como resultado la producción de otras citocinas, un aumento en el número de receptores de superficie para otras moléculas o la supresión de su propio efecto mediante inhibición por retroalimentación.

30 Quimiocina se refiere a una clase específica de citocinas que median en la quimioatracción (quimiotaxis) entre células. Estas quimiocinas son citocinas proinflamatorias inducibles por activación que tienen generalmente una masa molecular de entre 8 y 10 kDa. Sus receptores son principalmente proteínas integrales de la membrana que contienen siete hélices que abarcan la membrana, que están acopladas a proteínas G.

35 Se liberan quimiocinas a partir de una amplia variedad de células en respuesta a infección bacteriana, virus y agentes que provocan daño físico. Funcionan principalmente como quimioatrayentes para leucocitos, reclutando monocitos, neutrófilos y otras células efectoras de la sangre a los sitios de infección o daño. Pueden liberarse por muchos tipos de células diferentes y sirven para guiar a las células implicadas en la inmunidad innata y también a los linfocitos del sistema inmunitario adaptativo. Algunas quimiocinas tienen también papeles en el desarrollo de linfocitos, migración y angiogénesis.

40 Puesto que las citocinas y quimiocinas están implicadas en una multitud de diferentes enfermedades y estados patógenos o perjudiciales, hay una necesidad general de poder afectar a o modular la expresión y/o liberación de estos compuestos. Además, tal modulación de la liberación/expresión debe ser preferiblemente selectiva en cuanto a afectar sólo a un número limitado de quimiocinas o citocinas diana.

45 El documento [1] investiga el efecto de superficies de titanio sobre la activación de macrófagos y la secreción de quimiocinas y citocinas proinflamatorias. Cuando se unen a superficies de titanio rugosas, macrófagos estimulados por lipopolisacárido (LPS) aumentaban su secreción de las citocinas interleucina-1 β (IL-1 β), IL-6 y factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y las quimiocinas proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MIP-1) y proteína inflamatoria de macrófagos-1 α (MCP-1 α).

50 El documento [2] da a conocer que partículas de titanio estimulan la inducción selectiva de las quimiocinas IL-8 y MCP-1 en células de osteosarcoma similares a osteoblastos humanas.

55 El documento [3] investiga el efecto de partículas de titanio sobre la liberación de citocinas por células similares a macrófagos (MLC). Las partículas de titanio potenciaban significativamente la liberación por MLC de IL-1 β , IL-8 y TNF- α .

El documento [4] proporciona una visión general de las interacciones de macrófagos con superficies de materiales modificadas. El documento da a conocer que macrófagos puestos en contacto con superficies modificadas liberan IL-1 β , IL-6, IL-10 y TNF- α .

5 El documento US 6.527.951 da a conocer una columna de cromatografía con filtros que tienen un volumen mínimo. La columna de cromatografía se empaqueta con medios de fase sólida, tales como partículas de óxido de silicio, óxido de titanio, óxido de zirconio, carbono, material polimérico hidrocarbonado o combinaciones de los mismos.

10 El documento WO 2006/055675 da a conocer un dispositivo para realizar separaciones que tiene una cámara para contener medios de separación en forma de partículas seleccionadas de sílice, polímeros orgánicos, aluminio, zirconio y combinaciones de los mismos.

15 El documento EP 0 686 848 da a conocer una cromatografía líquida con una columna de cromatografía que comprende medios porosos en forma de un núcleo de resina cubierto por polvos inorgánicos, tales como gel de sílice, óxido de titanio, hidroxiapatita.

Sumario

20 La presente invención supera estas y otras desventajas de las disposiciones de la técnica anterior.

Es un objeto general de la presente invención proporcionar una modulación selectiva de la quimiocina proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10.

25 Es otro objeto de la invención proporcionar una composición que puede usarse para purificar una muestra de IP-10.

Aún otro objeto de la invención es proporcionar una composición que puede usarse para reducir la expresión de IP-10.

30 Estos y otros objetos se cumplen mediante la invención tal como se define mediante las reivindicaciones de patente adjuntas.

35 En resumen, la presente invención implica el uso de un metal o un óxido de metal que tiene la capacidad de unir selectivamente IP-10 a su superficie. El metal (óxido) tiene además un efecto de regulación por disminución de IP-10 porque un contacto entre la superficie de metal y una célula que produce IP-10 provocará una reducción en la producción de IP-10 de esa célula.

40 El metal u óxido de metal de la presente invención es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio. Tales metales preferidos incluyen titanio y tantalio y sus óxidos. Más preferiblemente, el metal es un óxido de titanio, tal como dióxido de titanio.

45 Los metales y óxidos de metales de la presente invención pueden usarse para fabricar un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad caracterizada por expresión adversa y/o liberación de IP-10. Tales enfermedades incluyen respuestas inflamatorias adversas, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunitarias, enfermedades de injerto contra huésped y reacciones de cuerpo extraño. En todas estas enfermedades, IP-10 es un factor clave en el desarrollo de las enfermedades y puede usarse una reducción de IP-10 para tratar y/o prevenir las enfermedades.

50 El método también implica métodos de tratamiento de una enfermedad caracterizada por expresión adversa y/o liberación de IP-10 en un sujeto. Un primer método implica administrar un medicamento de la presente invención al sujeto que padece la enfermedad. Un segundo método implica un tratamiento *ex vivo* de un fluido corporal extraído del sujeto. En este método, IP-10 se elimina en una filtración *ex vivo* usando los metales u óxidos de metales de la invención y la sangre purificada puede devolverse entonces al sujeto particular.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La invención junto con objetos y ventajas adicionales de la misma puede entenderse de la mejor manera haciendo referencia a la siguiente descripción tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:
- la figura 1 es un diagrama que ilustra el efecto de gránulos de titanio grises (GG) sobre la liberación de IP-10 en sangre humana completa;
- 10 la figura 2 es un diagrama que ilustra el efecto del tratamiento previo (-1t) frente al tratamiento posterior (+1t) con gránulos de titanio grises (GG) sobre la liberación de IP-10 en sangre humana completa;
- la figura 3 es un diagrama que ilustra la expresión génica relativa de IP-10 en monocitos y leucocitos totales tras la incubación de sangre completa con gránulos de titanio;
- 15 la figura 4 es un diagrama que ilustra el efecto de gránulos de titanio grises (GG) sobre la expresión génica de IP-10 en monocitos tras incubar sangre completa con gránulos de titanio;
- la figura 5 es un diagrama que ilustra el recuento de WBC total y diferencial tras la incubación con y sin gránulos de titanio grises (GG);
- 20 la figura 6 es un diagrama que ilustra la concentración de IP-10 en un sistema de bucle de sangre con sangre no tratada e infectada (LPS) con o sin gránulos de titanio;
- 25 la figura 7 es un diagrama que ilustra los niveles de IP-10 en un sistema de bucle de sangre con uso de gránulos de titanio grises (GG), gránulos de titanio grises tamizados (GP), gránulos de titanio blancos (WG) y gránulos de titanio blancos molidos (WP);
- la figura 8 es un diagrama que ilustra los niveles de IP-10 en un sistema de bucles de sangre usando diferentes cantidades de gránulos de titanio blancos molidos (WP) añadidos;
- 30 la figura 9 es un diagrama que ilustra el efecto de gránulos de titanio blancos molidos (WP) sobre el nivel de IP-10 en líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide;
- 35 la figura 10 es un diagrama que ilustra el efecto de diferentes cantidades de gránulos de titanio blancos molidos (WP) sobre el nivel de IP-10 en líquido sinovial (SF) de un paciente con artritis reumatoide;
- la figura 11 ilustra micrografías electrónicas de barrido que muestran gránulos de titanio grises (A, C, E) y blancos (B, D, F) (250x, 2000x, 5000x aumentos);
- 40 la figura 12 ilustra curvas del logaritmo del volumen de intrusión de mercurio diferencial frente a tamaño de poro para gránulos de titanio grises (A) y blancos (B);
- la figura 13 es un diagrama que ilustra el efecto de diferentes formas de titanio y otros metales sobre IP-10 en suero con adiciones conocidas de IP-10;
- 45 la figura 14 es un diagrama que ilustra el efecto de diferentes formas de titanio y otros metales sobre IP-10 en líquido sinovial (SF);
- 50 la figura 15 es una ilustración esquemática de una herramienta que puede usarse según la presente invención en la eliminación de IP-10 de un fluido corporal; y
- la figura 16 es una ilustración esquemática de otra herramienta que puede usarse según la presente invención en la eliminación de IP-10 de un fluido corporal.

55

Descripción detallada

En todos los dibujos, se usarán los mismos caracteres de referencia para elementos correspondientes o similares.

La presente invención se refiere generalmente a una modulación selectiva de quimiocinas y citocinas específicas. La presente invención enseña que determinados metales y óxidos de metales pueden reducir la expresión y liberación de una quimiocina particular y actuar como eliminadores de quimiocinas. Esto era totalmente inesperado, ya que la técnica anterior tal como se ilustra mediante los documentos [1-4] muestra que el metal titanio provoca una regulación por incremento en la producción de citocinas y quimiocinas por diferentes tipos de células.

Por tanto, la presente invención puede usarse para prevenir y/o tratar estados médicos y patológicos caracterizados por expresión adversa o liberación de la quimiocina particular.

La quimiocina relevante que puede reducirse según la presente invención es proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa (10000 Dalton), IP-10. IP-10, también denominada ligando 10 de motivo C-X-C (CXCL10) o Crg-2 en la técnica, pertenece a la familia de quimiocinas CDC, que tienen una secuencia de aminoácidos específica de ELR (código de aminoácidos de una letra) inmediatamente antes de la primera cisteína. Estas quimiocinas CXC inducen migración de neutrófilos. Sin embargo, IP-10 parece diferir de la mayoría de las quimiocinas CXC porque no tiene actividad sobre neutrófilos y selecciona como diana linfocitos específicamente. IP-10 actúa sobre el receptor CXCR3 también como un receptor específico de IP-10 en células epiteliales y endoteliales [5]. IP-10 se secreta por varios tipos de células en respuesta a interferón- γ (IFN- γ). Estos tipos de células incluyen monocitos, células endoteliales y fibroblastos.

Los metales y óxidos de metales según la presente invención que tienen el efecto de reducción de IP-10 son metales y óxidos de metales del grupo 4 ó 5 en la tabla periódica de los elementos y seleccionados del grupo que consiste en titanio (Ti), zirconio (Zr), hafnio (Hf), niobio (Nb) y tantalio (Ta) y diferentes óxidos de estos metales. Los metales preferidos incluyen titanio y tantalio y sus óxidos, en particular titanio y óxidos de titanio.

El titanio tiene tres estados de oxidación, Ti (II), Ti (III) y Ti (IV). La presente invención puede usar cualquiera de estos óxidos de titanio, es decir, óxido de Ti (II), óxido de Ti (III) y óxido de Ti (IV). El óxido de Ti (IV) se denomina también dióxido de titanio (TiO₂) o titania en la técnica. Este dióxido de titanio es una forma de óxido preferida de titanio según la presente invención. TiO₂ puede estar presente en diferentes formas minerales o cristalinas, incluyendo rutilo, anatasa y brookita. El rutilo es un mineral tetragonal habitualmente de hábito prismático, la anatasa u octahedrita es un mineral tetragonal de hábito dipiramidal, mientras que la brookita es un mineral ortorrómbico. Un dióxido de titanio preferido según la presente invención está preferiblemente en la forma rutilo o una mezcla de la forma rutilo y la anatasa.

Un óxido de zirconio preferido es óxido de Zr (IV) y óxido de Hf (IV) es un óxido de hafnio preferido. El óxido de niobio puede estar en la forma de óxido de Ni (V) u óxido de Ni (III) y el tantalio tiene estados de oxidación de Ta (II), Ta (IV) y Ta (V).

Un agente de metal que elimina o reduce IP-10 según la presente invención comprende al menos un metal del grupo 4 ó 5 y/o al menos un óxido de un metal del grupo 4 ó 5. El agente de metal podría ser un metal u óxido de metal en forma sustancialmente pura, tal como al menos aproximadamente el 95% de metal u óxido de metal, preferiblemente al menos el 96, 97, 98 ó 99% de metal u óxido de metal. No es necesario que el metal tenga que estar en forma pura, sino que puede haber diferentes compuestos químicos o composiciones, además de óxidos de metal, con el metal. Pueden usarse también aleaciones que comprenden al menos un metal y/o al menos un óxido de metal según la presente invención.

Los metales y óxidos de metales de la presente invención pueden reducir IP-10 según diferentes mecanismos fundamentales.

En primer lugar, los metales y óxidos de metales actúan como un eliminador de IP-10 porque IP-10 en el medio circundante se unirá específicamente a la superficie de los metales y óxidos de metales. Por tanto, se enriquecerá IP-10 sobre la superficie del metal (óxido) y por tanto se agotará del medio circundante. Esta unión IP-10-metal (óxido) es altamente específica ya que otras quimiocinas no se unen a los metales a los niveles de IP-10, incluyendo la interleucina 8 estructural y químicamente relacionada (IL-8, también denominada CXCL8) que pertenece al grupo CXCL de quimiocinas y proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1, también denominada CCL2) que tiene un tamaño molecular en el intervalo de IP-10 (las dos quimiocinas contienen 98 ó 99 aminoácidos). El bloqueo de la superficie del metal (óxido) con

BSA o suero bovino fetal no afecta a la unión de IP-10 a la superficie. La unión es también altamente fuerte ya que no era posible separar IP-10 unida de la superficie mediante detergentes añadidos (Tween-20).

5 El metal y los óxidos de metales de la presente invención actúan como un eliminador de IP-10 altamente específico a través de la unión IP-10-metal (óxido) selectiva. Como consecuencia, los metales y óxidos de metales pueden usarse para purificar un medio de IP-10 no deseada y eliminar de ese modo o al menos reducir la concentración y cantidad de IP-10 en el medio.

10 En segundo lugar, cuando se ponen en contacto células que producen IP-10 con un metal u óxido de metal de la presente invención, la interacción célula-metal provoca una regulación por disminución en la producción de IP-10 tal como se determina a partir de la producción reducida de ARNm de IP-10. Esto, a su vez, tiene la consecuencia de reducir el nivel de IP-10 recién producida. Experimentos han mostrado también que los metales de la invención pueden de hecho unirse a células que producen IP-10 conocidas, tales como neutrófilos y monocitos.

15 Por tanto, los metales y óxidos de metales de la presente invención pueden reducir IP-10 eliminando IP-10 de un medio a través de la unión a IP-10 y la reducción de la cantidad de expresión de IP-10 provocando una regulación por disminución de la producción de ARNm de IP-10.

20 Puesto que los metales y óxidos de metales de la invención provocan la reducción de IP-10 al menos parcialmente uniendo moléculas de IP-10 a su superficie de metal (óxido), los metales y óxidos de metales están preferiblemente en una forma que tiene un área superficial específica alta, es decir, área superficial por unidad de peso.

25 El agente de metal (óxido) puede estar, en una primera realización, en forma de gránulos, granos o granulados porosos. Los gránulos pueden producirse mediante el procedimiento de Kroll o procedimiento de Hunter bien conocido. Los gránulos resultantes son altamente porosos y tienen una gran área superficial específica. Esta área superficial específica de los gránulos de metal porosos es preferiblemente de al menos 0,005 m²/g, tal como al menos aproximadamente 0,01 m²/g, más preferiblemente de manera aproximada o más de 0,02 m²/g, tal como aproximadamente 0,055 m²/g.

30 La porosidad preferida de los gránulos implica que los gránulos incluyen múltiples poros, incluyendo micro y/o macroporos, que son continuos a través de los gránulos, y aberturas de los múltiples poros y conductos o pasos que interconectan al menos una parte de los múltiples poros. La porosidad del agente de metal (óxido) es preferiblemente de al menos el 25%, más preferiblemente de al menos el 40%, tal como de al menos aproximadamente el 50%. Pueden fabricarse y usarse gránulos de metal altamente porosos que tienen una porosidad de aproximadamente o más del 70% según la presente invención.

35 En lugar de proporcionar gránulos de metal altamente porosos en tamaños de mm o sub mm, pueden usarse según la presente invención partículas de metal (óxido) más pequeñas que tienen un diámetro promedio de 100 μm o menos, tal como unos cuantos μm o incluso más pequeño en el intervalo sub μm. Tales partículas de metal pequeñas o polvo proporcionarán una gran área superficial incluso en pequeñas cantidades.

40 Un primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de un metal u óxido de metal en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad caracterizada por expresión adversa y/o liberación de IP-10 en un sujeto. El metal se selecciona de al menos un metal de titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio del grupo 4 ó 5 en la tabla periódica de elementos, al menos un óxido de un metal de titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio del grupo 4 ó 5 o una mezcla de al menos uno de titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio y al menos un óxido de titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.

45 El agente de metal (óxido) de la presente invención puede usarse para prevenir enfermedades administrándose a un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero y más preferiblemente un sujeto humano, que es probable que padezca una enfermedad caracterizada por expresión de IP-10 adversa. En tal caso, el agente de metal provocará una reducción en la producción de IP-10 en el sujeto, reduciendo la expresión de ARNm de IP-10. Además, una vez que/si IP-10 se produce a altos niveles en el sujeto, el agente de metal ya proporcionado unirá IP-10 a su superficie, reduciendo de ese modo el nivel de IP-10 que circula libremente e impidiendo que IP-10 tenga su efecto perjudicial de la enfermedad. Por tanto, un

agente de metal de la invención funcionará como una garantía que puede prevenir la aparición de una enfermedad dependiente de IP-10.

5 Además, un paciente que ya padece una enfermedad dependiente de IP-10 también se beneficiará del medicamento de la presente invención puesto que el agente de metal eliminará la IP-10 ya producida a través de la unión metal-IP-10. Además, se estimulará que células que producen IP-10 desactiven o al menos reduzcan su producción de IP-10.

10 Las enfermedades o estados médicos que pueden tratarse y/o prevenirse según la presente invención incluyen enfermedades dependientes de IP-10 caracterizadas por niveles adversos (altos) de producción de IP-10 en el sujeto. La presente invención es en particular útil para tratar o prevenir reacciones inflamatorias adversas, en las que una reacción inflamatoria perjudicial de este tipo puede tener causas enormemente diferentes, tales como infecciones, enfermedades inflamatorias, reacciones de cuerpo extraño y enfermedades de injerto contra huésped.

15 Cuando un sujeto se infecta, normalmente se eleva IP-10 como parte de la defensa inmunitaria contra bacterias, virus, parásitos, hongos, priones, viroides u otros patógenos. Sin embargo, en situaciones en las que el sistema inmunitario normal está alterado, tal como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la respuesta inmunitaria normal puede ser devastadora cuando el equilibrio está distorsionado. Es decir, el sistema inmunitario está provocando más daño al tejido/cuerpo que la infección. En pacientes
20 con SIDA infectados con criptosporidiosis, IP-10 estaba significativamente aumentada y se correlacionaba con la carga de parásito. IP-10 se localizaba específicamente en células epiteliales en el sitio de infección y cuando se trataba la infección, los niveles de IP-10 se normalizaban. Estos resultados sugieren que IP-10 es importante para la resolución de la infección en la defensa inmunitaria normal, mientras que
25 en pacientes con SIDA que carecen de células efectoras, IP-10 puede contribuir a la inmunopatogénesis [6].

30 IP-10 puede promover la infección por retrovirus, tal como virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), directamente [7] o a través del reclutamiento de células diana activadas [8]. El nivel de IP-10 en el líquido cefalorraquídeo (LCR) está estrechamente asociado con el nivel de VIH en el LCR, lo que sugiere que IP-10 es tanto una respuesta a como un determinante de la infección local [9].

35 A la patogénesis de la infección viral fiebre amarilla (FA) contribuyen en gran medida citocinas y se encontró que IP-10 era significativamente superior en FA mortal que en FA no mortal. Estos resultados sugieren que la intervención con citocinas es una posible estrategia terapéutica para el tratamiento de pacientes infectados [10].

40 El resfriado común se induce a menudo por infección viral, por ejemplo, por rinovirus. Tras la infección por rinovirus de células epiteliales humanas, se ha mostrado que las células epiteliales producen IP-10 tanto *in vitro* como *in vivo*. El nivel de IP-10 se correlacionaba con la gravedad de los síntomas y por tanto se sugiere que IP-10 desempeña un papel en la patogénesis del resfriado inducido por virus [11].

45 Por tanto, la presente invención puede usarse para tratar o prevenir diferentes enfermedades infecciosas caracterizadas por expresión de IP-10 adversa, en particular enfermedades infecciosas virales, incluyendo SIDA, VIH y fiebre amarilla.

50 Las enfermedades autoinmunitarias son una forma particular de enfermedades inflamatorias, que dan como resultado una respuesta inmunitaria contra las propias células y tejidos del cuerpo. IP-10 es un agente clave en respuestas inmunitarias, específicamente en reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH). Tales reacciones de DTH implican enfermedades autoinmunitarias. Por tanto, una reducción de IP-10 provocada por los metales y óxidos de metales de la invención puede ser una cura eficaz o una medida preventiva para diferentes enfermedades autoinmunitarias. Los ejemplos de enfermedades autoinmunitarias que podrían tratarse o prevenirse mediante el agente de metal de la presente invención incluyen encefalomiелitis diseminada aguda (EMDA), enfermedad de Addison, espondilitis anquilosante,
55 síndrome de anticuerpos anti-fosfolípidos (SAAF), anemia aplásica, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria, enfermedad celiaca, enfermedad de Crohn, diabetes mellitus de tipo 1, penfigoide gestacional, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré (SGB), enfermedad de Hashimoto, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Kawasaki, lupus eritematoso, esclerosis múltiple (EM), miastenia grave, síndrome de opsoclonía-mioclónia (SOM), neuritis óptica, tiroi-

ditis de Ord, pénfigo, anemia perniciosa, cirrosis biliar primaria, artritis reumatoide (AR), síndrome de Reiter, síndrome de Sjögren, arteritis de Takayasu, arteritis temporal (también conocida como arteritis de células gigantes), anemia hemolítica autoinmunitaria caliente y granulomatosis de Wegener.

5 La EM es una enfermedad autoinmunitaria en la que el cuerpo produce anticuerpos contra la mielina que protege los nervios en el cerebro y médula espinal dando como resultado pérdida nerviosa. En pacientes con EM, el líquido cefalorraquídeo contiene altos niveles de IP-10 y la acumulación de células T en el sistema nervioso central es muy importante en la patogénesis de la enfermedad. Por tanto, IP-10 es una posible diana en la búsqueda de terapias para la EM [12]. Se ha mostrado que IP-10 se concentra en las
10 lesiones del tejido nervioso dañado [13-15]. Experimentos han mostrado que la gravedad del estado patológico se correlaciona con la cantidad de IP-10 expresada [16], y el bloqueo de IP-10 (tratamiento con anticuerpos, vacuna de ADN, terapia antisentido e inmunotoxina unida a IP-10) daba como resultado mejora clínica en diferentes modelos de ratón [17, 18]. Por tanto, el uso de un agente de metal según la presente invención puede ser un medicamento eficaz para tratar o prevenir EM distinto de agentes que
15 bloquean IP-10 conocidos que han tenido efectos positivos.

La AR es una enfermedad autoinmunitaria en la que se ha mostrado que IP-10 es activa. Se ha detectado un aumento de hasta cien veces en la concentración de IP-10 en líquido sinovial (LS) de pacientes con AR [19]. Esta IP-10 puede atraer selectivamente células T al LS y contribuir a la patogénesis de la
20 AR [20]. Se induce IP-10 en el LS mediante moléculas de adhesión específicas y la administración de anticuerpos contra estas moléculas inhibe significativamente la inducción de IP-10 [21]. Datos de expresión de receptores de IP-10, y otras quimiocinas, sugieren que el sistema de quimiocinas desempeña un papel directo en la fase destructiva de la AR [22]. Una reducción en la producción de IP-10 y los niveles de IP-10 provocada por la presente invención será beneficiosa en el tratamiento y la prevención de la
25 AR.

En hepatitis crónica y enfermedades hepáticas autoinmunitarias, IP-10 está elevada y se reduce tras el tratamiento satisfactorio con IFN. IP-10 desempeña un papel específico en la acumulación y muerte de hepatocitos en hepatitis crónica [23]. Se obtuvieron resultados similares en pacientes con enfermedad
30 hepática autoinmunitaria [24].

IP-10 está regulada por incremento en lesiones cutáneas de pacientes con lupus eritematoso discoide crónico [25] y pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) tienen un nivel sérico de IP-10 aumentado y este nivel de IP-10 se correlaciona con el nivel de actividad de la enfermedad [26]. Por tanto, el metal (óxido) que comprende un medicamento de la invención puede usarse también para tratar y/o prevenir estos tipos de enfermedades autoinmunitarias.
35

La respuesta inflamatoria que va a tratarse o prevenirse mediante el medicamento de la presente invención puede deberse a una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo de un sujeto. Los ejemplos de tales enfermedades inflamatorias incluyen enfermedad inflamatoria del intestino (EII), colitis ulcerosa (CU) y enfermedad de Crohn (EC, que es una enfermedad autoinmunitaria que afecta al tubo digestivo). Estas enfermedades son trastornos crónicos graves del tubo digestivo con origen poco claro. Pruebas crecientes sugieren que quimiocinas producidas localmente desempeñan papeles importantes en la progresión de las enfermedades [27]. EII [28], CU [29] y EC [30] se caracterizan por un aumento en la expresión de
45 proteína IP-10 en el intestino inflamado y se ha discutido la implicación terapéutica inhibiendo la ruta de señalización de IP-10 [31]. El bloqueo de la señalización por IP-10 mediante la administración de anticuerpos contra IP-10 dio como resultado protección frente a colitis aguda [32] así como colitis crónica [33]. El butirato inhibe la liberación de IP-10 [34] y se ha mostrado que es eficaz en el tratamiento de pacientes con CU [35]. Ratones deficientes en IFN- γ , en los que la ruta de IP-10 está suprimida, no podían desarrollar colitis en respuesta a la estimulación con sulfato de dextrano que ratones de tipo natural normales si pueden desarrollar [28]. Se han desarrollado anticuerpos contra IP-10 para el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino [59]. Estos resultados experimentales indican que puede usarse un medicamento que inhibe IP-10 de la presente invención para tratar y/o prevenir enfermedades infla-
50 matorias del tubo digestivo, incluyendo EII, CU y EC.

55 El medicamento de la presente invención es también altamente eficaz en el tratamiento y/o la prevención de enfermedades inflamatorias. Por ejemplo, IP-10 está regulada por incremento en lesiones cutáneas de pacientes con liquen (fuerte expresión de IP-10), lupus eritematoso discoide crónico (fuerte expresión de IP-10), dermatitis de contacto alérgica (fuerte expresión de IP-10) y psoriasis (débil expresión de IP-

10) [25]. En estas lesiones, estaba presente una alta cantidad de células T activas infiltrantes, lo que sugiere una interacción funcional entre quimiocinas producidas localmente y células T que expresan CXCR3. Por tanto, la ruta de IP-10 parece desempeñar un papel significativo en el reclutamiento y mantenimiento de infiltrados de células T en las enfermedades cutáneas inflamatorias. Las respuestas inflamatorias adversas adicionales que la presente invención puede tratar y/o prevenir incluyen glaucoma y respuestas inflamatorias asociadas con glaucoma.

Se ha mostrado recientemente que IP-10 se produce y se secreta por adipocitos [36] y se ha encontrado previamente en lesiones ateroscleróticas junto con células T activadas [37]. Estudios experimentales en ratones susceptibles a aterosclerosis mostraron que IP-10 es un agente clave crucial en la formación de lesiones mediante modulación local del sistema inmunitario. Estos resultados en ratones deficientes en IP-10 también mostraron que al inhibir la ruta de IP-10 había una tendencia a reducir la cantidad de células T proinflamatorias y a aumentar la población de células T protectoras que inhiben el proceso aterosclerótico [38]. Estos últimos hallazgos en modelos animales sugieren que el bloqueo de las interacciones quimiocina/receptor de quimiocina pueden servir como enfoque adecuado para tratar la aterosclerosis. Asimismo, antagonistas de quimiocinas que inhiben el reclutamiento de leucocitos podrían ser particularmente interesantes para tratar la inflamación en respuesta a infarto de miocardio, la principal consecuencia de la aterosclerosis [39]. Por tanto, el medicamento de la presente invención que da como resultado una expresión de IP-10 reducida y niveles de IP-10 reducidos en un sujeto puede ser eficaz para tratar y/o prevenir la aterosclerosis.

Otra respuesta inflamatoria adversa que se caracteriza por expresión de IP-10 adversa es asma. En un modelo de ratón de asma, se ha mostrado que IP-10 contribuye a la hiperreacción problemática en las vías respiratorias. Ratones deficientes en IP-10 demostraron los resultados opuestos en comparación con animales de tipo natural, lo que indica que la ruta de IP-10 es una diana de la terapia contra el asma [40, 41]. Las quimiocinas e IP-10 tienen también un impacto sobre otros estados que afectan negativamente a las vías respiratorias de un sujeto. La enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) es un estado que se caracteriza por obstrucción irreversible de las vías respiratorias debido a estrechamiento de las vías respiratorias pequeñas y la destrucción del parénquima del pulmón. El estado provoca inflamación de las vías respiratorias, implicando a granulocitos neutrófilos, macrófagos y linfocitos. IP-10 está regulada por incremento en las vías respiratorias de pacientes con EPOC [42]. Por tanto, el medicamento de la presente invención puede usarse para tratar y/o prevenir EPOC y otros estados inflamatorios que afectan a las vías respiratorias.

Cuando se trasplanta un implante al cuerpo de un sujeto, se desencadenará una reacción de cuerpo extraño. Esta reacción es una forma especial de reacción inflamatoria adversa provocada por la introducción de material extraño, por ejemplo un implante, en el sujeto. Una reacción inflamatoria de este tipo se caracteriza por un aumento en la secreción de IP-10, y en la que IP-10 puede ser una molécula efectora clave en la reacción inflamatoria. Por tanto, una reducción en los niveles de IP-10 reducirá la respuesta inflamatoria frente al implante extraño y de ese modo inhibirá la reacción de cuerpo extraño.

Los metales y óxidos de metales de la presente invención pueden usarse también para prevenir o tratar enfermedades de injerto contra huésped. Por tanto, la invención puede usarse conjuntamente con trasplante de injerto para prevenir o al menos reducir el riesgo de rechazo del injerto, en particular la fase aguda de rechazo del injerto. El desenlace del trasplante se basa principalmente en la reacción en el huésped frente al injerto ya que el rechazo del órgano, el tejido o las células es problemático de tratar. En la fase de rechazo agudo de un injerto, aumenta IP-10 y puede usarse como marcador de diagnóstico en el proceso de rechazo puesto que IP-10 se correlaciona con la gravedad del rechazo [43-46]. Experimentos han mostrado que el trasplante de injertos en presencia de anticuerpos dirigidos contra IP-10 o injertos de ratones deficientes en IP-10 daba como resultado mayor supervivencia del injerto y menos células T infiltrantes en el trasplante [47, 48]. También se ha mostrado lo contrario, es decir, los injertos sobreviven más en animales sin la capacidad para responder a IP-10 [49]. Se han desarrollado antagonistas para la ruta de señalización de IP-10 y se han sugerido como terapia que podría mejorar el desenlace de los trasplantes [50]. Tomados conjuntamente, estos resultados indican que los agentes de metal que reducen y eliminan IP-10 de la presente invención pueden ser medicamentos muy eficaces en el tratamiento o la prevención del rechazo de injerto de injertos de tejido, injertos de órganos o injertos de células trasplantados, tales como islotes de Langerhans.

La infiltración de leucocitos está implicada en varios tipos de cáncer (neoplasia). Estos leucocitos infiltrantes pueden ser una posible fuente de factores de crecimiento para las células tumorales y factores angiogénicos para las células endoteliales. Se ha mostrado que IP-10 es una citocina implicada en tales cánceres. Además, puesto que las quimiocinas son mediadores importantes del reclutamiento de leucocitos y demuestran características de expresión y activación alteradas en tejido inflamado de manera crónica, se han implicado como reguladores clave de la inflamación y la angiogénesis durante el desarrollo del cáncer.

La activación crónica de células inmunitarias innatas en sitios de crecimiento de tumores premalignos puede potenciar el desarrollo tumoral. Se ha hecho evidente también que las respuestas inflamatorias tempranas y persistentes observadas en o alrededor de muchos tumores sólidos desempeñan papeles importantes en el establecimiento de un entorno adecuado para la progresión neoplásica proporcionando diversos factores que alteran la homeostasis del tejido [51-53]

Por tanto, las enseñanzas de la presente invención pueden usarse para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto.

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o trastorno caracterizado por expresión adversa y/o liberación de IP-10 en un sujeto, preferiblemente un sujeto mamífero y más preferiblemente un sujeto humano. El método comprende administrar un metal y/o un óxido de un metal al sujeto que padece la enfermedad, en el que el metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.

Según la invención, los metales u óxidos de metales pueden proporcionarse como formulaciones farmacéuticamente aceptables usando métodos de formulación conocidos por los expertos habituales en la técnica. Estas formulaciones pueden administrarse por vías convencionales. En general, el copolímero puede administrarse por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía subcutánea, por vía bucal, por vía rectal, por vía dérmica, por vía nasal, por vía oral, por vía traqueal, por vía bronquial, por vía tópica, por cualquier otra vía parenteral o mediante inhalación, en forma de una preparación farmacéutica que comprende el principio activo en una forma farmacéutica farmacéuticamente aceptable. La vía de administración particular a usar dependerá, entre otros, del trastorno o síntoma a tratar y puede determinarse por un médico. Por ejemplo, una administración dérmica puede ser útil para tratar trastornos cutáneos inflamatorios, mientras que una administración oral o rectal será beneficiosa para sujetos con reacciones inflamatorias en el tubo digestivo.

En administración intravenosa, la composición médica farmacéutica comprende el metal u óxido de metal de la invención en una disolución de un disolvente seleccionado. En una implementación de administración particular, la disolución que contiene el metal u óxido de metal se inyecta una vez o preferiblemente en múltiples momentos a una persona que necesita tratamiento. Podría ser posible también emplear un suministro continuo o semicontinuo del medicamento a partir por ejemplo de una bomba médica u otro equipo de administración. También son posibles administraciones a través de la denominada liberación lenta y dentro del alcance de la presente invención.

En otra implementación particular, puede usarse una administración local en o en relación con el sitio inflamatorio para permitir una concentración local relativamente alta del principio activo. Esta administración local puede ir acompañada de una o más administraciones sistemáticas.

En general, las formulaciones se preparan poniendo en asociación de manera uniforme e íntima el principio activo con vehículos preferiblemente líquidos o algunas veces vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas sellados, y pueden almacenarse en condiciones secadas por congelación (liofilizadas) que requieren sólo la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyecciones, inmediatamente antes de

su uso. La fase acuosa puede ser solución salina tamponada con fosfato fisiológica u otra disolución salina fisiológica.

5 Pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración oral como cápsulas, cachets o comprimidos que contienen cada uno una cantidad predeterminada del principio activo, como un polvo o gránulos; como una disolución o una suspensión o emulsión en un líquido acuoso o un líquido no acuoso. Pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración tópica a la piel como pomadas, cremas, geles y pastas, que comprenden el principio que va a administrarse en un vehículo farmacéutico aceptable. Pueden presentarse formulaciones para administración rectal como supositorio con una base
10 adecuada que comprende, por ejemplo, manteca de cacao o un salicilato. Pueden presentarse formulaciones adecuadas para administración vaginal como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones de pulverizador que contienen además del principio activo vehículos tales como los que se sabe en la técnica que son apropiados.

15 Ejemplos de formulaciones de dosificación unitarias son las que contienen una unidad o dosis diaria, subdosis diaria, tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, o una fracción apropiada de la misma, del principio administrado.

20 La dosificación permisible máxima que puede usarse según la presente invención depende, entre otros, del trastorno particular a tratar, el paciente particular, la gravedad de la reacción inflamatoria y la vía de administración. Resultados experimentales han indicado que gránulos de titanio molidos y tratados con calor tienen una capacidad de unión a IP-10 de más de 2000 pg de IP-10/mg de partículas de titanio para PBS con adiciones conocidas de IP-10, de aproximadamente 50 pg de IP-10/mg de partículas de titanio en suero con adiciones conocidas de IP-10 y de más de 3,5 pg de IP-10/mg de partículas de titanio en
25 líquido sinovial. Estos números puede usarlos un médico en la determinación de la cantidad de partículas de metal (óxido) a administrar puesto que la cantidad de IP-10 presente en un fluido corporal es, para varios trastornos médicos, proporcional a la gravedad del trastorno.

30 El agente de metal de la invención se proporciona preferiblemente (trasplanta, inyecta o administra de otra forma) en o en las proximidades del sitio en un paciente en el que se desea un control o modificación de la expresión/liberación de IP-10 local. Esta administración puede realizarse trasplantando los gránulos o partículas a o cerca del sitio diana. Alternativamente, cuando se utilizan especialmente gránulos y polvo, el agente de metal (óxido) de la presente invención puede inyectarse en el sitio diana. Puesto que las quimiocinas pueden transportarse a través del sistema sanguíneo de un paciente, el agente de
35 metal de la presente invención puede usarse también para una administración sistémica general y todavía puede afectar a la expresión y liberación de la quimiocina IP-10 diana seleccionada a partir de células en el sistema sanguíneo y vasos, en líquido sinovial, líquido cefalorraquídeo, ascitis o en líquido linfático.

40 Un método alternativo de tratamiento o prevención de una enfermedad caracterizada por expresión adversa/liberación de IP-10 implica un tratamiento *ex vivo* de un fluido corporal de un paciente que padece la enfermedad. El método implicaría extraer un fluido corporal de un sujeto que padece la enfermedad. El fluido corporal contiene altos niveles adversos de IP-10 y/o células que producen IP-10. El fluido corporal podría ser sangre, plasma sanguíneo, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, ascitis y/o líquido sinovial, dependiendo del tratamiento particular. El fluido corporal extraído se pone en contacto *ex vivo* con un
45 metal o un óxido de un metal, en el que el metal es un metal del grupo 4 ó 5. En este contacto de metal-fluido, IP-10 presente en el fluido corporal se unirá a la superficie de las partículas de metal (óxido) y de ese modo se eliminará del fluido. Además, cualquier célula que produzca IP-10 presente en el fluido corporal extraído, debido al contacto célula-superficie del metal, desactivará o al menos reducirá su producción de IP-10. El fluido corporal purificado puede devolverse entonces al sujeto. El método es similar a
50 una diálisis tradicional porque se extrae un fluido corporal y se purifica, en este caso de IP-10, antes de devolverse al cuerpo.

55 El contacto fluido-metal puede ser generalmente muy corto como la unión de IP-10 a la superficie de las partículas de metal de la presente invención. El tiempo de contacto podría ser de unos cuantos segundos hasta algunas decenas de minutos.

Esta forma de tratamiento puede combinarse con otras disposiciones de tratamiento, en las que se extrae un fluido corporal de un paciente y se devuelve entonces al cuerpo. Por ejemplo, puede combinarse una diálisis hepática o renal tradicional con una etapa de purificación extra, en la que se elimina IP-10 del

fluido corporal, normalmente sangre. Además, pacientes conectados a máquinas de corazón y/o pulmón, tales como máquinas de oxigenación por membrana extracorpórea (ECMO) pueden beneficiarse de una etapa de purificación de IP-10 adicional según la presente invención.

5 Esta forma de tratamiento es en particular ventajosa para pacientes que padecen choque septicémico tras una infección. Una etapa crucial en el salvamento de un paciente de este tipo es que el choque septicémico y la respuesta inflamatoria que provoca deben combatirse tan rápidamente como sea posible. Tales pacientes podrían conectarse a una diálisis de IP-10 *ex vivo* continua según la presente invención. El nivel de IP-10 en la sangre puede mantenerse entonces a un bajo nivel hasta que medicamentos adic-
10 cionales eliminan satisfactoriamente la causa del choque septicémico/infección.

El método de tratamiento tiene varias ventajas en comparación con la administración del agente de metal (óxido) al cuerpo del sujeto. En primer lugar, no se administran partículas de metal (óxido) al cuerpo y de ese modo no se generará ningún efecto secundario asociado con la administración de partículas de me-
15 tal. En segundo lugar, pueden utilizarse mayores cantidades de las partículas de metal y de ese modo una mayor capacidad de eliminación de IP-10 en comparación con la administración directa al cuerpo del sujeto. En tercer lugar, las partículas de metal pueden volverse a usar tras un procesamiento adecuado, en el que se han eliminado IP-10 unidas (y otras moléculas) de las superficies de las partículas.

20 Las figuras 15 y 16 ilustran esquemáticamente dos posibles disposiciones o herramientas que pueden usarse en relación con una purificación *ex vivo* de un fluido corporal extraído. En la figura 15, la disposición está básicamente en forma de una jeringuilla 10 llena de partículas 1 de metal (óxido) de la presente invención y que está equipada con un filtro 12 para impedir que las partículas 1 de metal se salgan de la jeringuilla 10. Durante un tratamiento, se extrae un fluido corporal, tal como líquido sinovial, del cuerpo
25 de un sujeto en la jeringuilla 1. El fluido pasa por el filtro 12 y entra en contacto con las partículas 1 de metal. Cualquier molécula de IP-10 presente en el fluido se unirá a la superficie de las partículas y de ese modo se elimina del fluido. Tras un tiempo de incubación, el fluido puede inyectarse de nuevo en el cuerpo (en el mismo o diferente sitio que el sitio de extracción). Debido a la elección cuidadosa de los poros del filtro, las partículas 1 permanecerán en la jeringuilla 10.

30 El tamaño de poro del filtro puede seleccionarse de modo que generalmente no están presentes células en el fluido corporal extraído que pasará a través del filtro 12 y que entrará en contacto con las partículas 1 de metal. Sin embargo, puede ser ventajoso permitir que las células que producen IP-10 presentes en el fluido corporal entren en contacto con las partículas 1 de metal y de ese modo se sometan a una re-
35 ducción de la producción de IP-10 debido al contacto célula-partícula. En tal caso, el tamaño de poro del filtro se selecciona para permitir que tales células que producen IP-10, por ejemplo monocitos, células endoteliales y fibroblastos, pero no las partículas 1 de metal, puedan pasar a través del filtro 12.

40 La figura 16 ilustra una disposición 20 que tiene una entrada de fluido separada y una salida de fluido separada. La disposición 20 forma una cámara de purificación definida por dos filtros 22 y 24. Esta cámara de purificación está llena de partículas 1 de metal (óxido) de la presente invención. Durante el funcionamiento, se bombea fluido corporal de un paciente a través del primer filtro 22. Allí, el fluido entra en contacto con las partículas 1 de metal y cualquier IP-10 presente en el fluido se unirá a la superficie de las partículas. Entonces, tras la incubación, el fluido purificado puede bombearse a través del segun-
45 do filtro 24 y puede devolverse entonces al cuerpo.

Se anticipa por la presente invención que los filtros 12, 22, 24 empleados en las disposiciones de las fi-
50 guras 15 y 16 pueden reforzarse mediante capas protectoras que impiden que las partículas 1 dañen los filtros 12, 22, 24.

Las disposiciones descritas anteriormente pueden emplearse también para tratar sangre extraída que no pretende devolverse al mismo sujeto. Por tanto, las disposiciones pueden usarse para reducir el nivel de IP-10 en, por ejemplo sangre o plasma, manipulado por un banco de sangre. Un método de este tipo podría implicar entonces poner en contacto una muestra corporal, tal como un fluido corporal, *in vitro*,
55 con un metal del grupo 4 ó 5 o un óxido de un metal del grupo 4 ó 5 para eliminar de ese modo IP-10 de la muestra corporal y preferiblemente también reducir el nivel de producción de IP-10 en la muestra corporal.

Experimentos

Efecto selectivo de citocinas y quimiocinas

5 Tras la infección, la liberación de agentes exógenos, por ejemplo LPS, y la inducción de mediadores endógenos, por ejemplo quimiocinas y citocinas, contribuye al reclutamiento de leucocitos circulantes al tejido inflamado. Productos microbianos como LPS desencadenan que múltiples tipos de células liberen citocinas, que a su vez son potentes inductores de quimiocinas. Las citocinas primarias actúan como activadores endógenos de la respuesta inmunitaria, mientras que las quimiocinas inducibles actúan como mediadores secundarios atrayendo a leucocitos [54]. Debido a esta compleja interacción entre citocinas y quimiocinas, es importante evaluar no sólo el efecto de los gránulos de metal (óxido) sobre la secreción de IP-10, sino también sobre la liberación de otras quimiocinas y citocinas, lo que podría proporcionar una indicación de la interacción sinérgica entre ellas en respuesta a LPS y al tratamiento con gránulos de titanio.

Incubación de sangre humana completa ex vivo con gránulos de Ti

Se usó un modelo de sangre humana completa *ex vivo* tal como se describió anteriormente [55]. En resumen, se anticoaguló sangre venosa de voluntarios sanos (n=7) con heparina (25 U/ml de sangre; Leo, Ballerup, Dinamarca) y entonces se incubó en tubos de microcentrífuga a 37°C con rotación lenta en presencia de lipopolisacárido (LPS) (10 ng/ml de sangre; LPS se derivaba de *Escherichia coli* serotipo B6:026; Sigma, St. Louis, MO) y dosificaciones crecientes de gránulos de titanio grises (0,015 g, 0,075 g, 0,150 g, 0,300 g; Hereford Metal Powder Co Ltd, RU). Se usó sangre incubada sólo con LPS o solución salina como control positivo y negativo, respectivamente.

Ensayo Luminex

A diferentes puntos de tiempo (3, 6 y 24 h), se obtuvo plasma mediante centrifugación a 7000 g durante 3 min. y se almacenó a -20°C. Se analizaron los niveles plasmáticos de veinticinco citocinas diferentes, véase la tabla 1, usando inmunoensayos de perlas múltiplex de tipo “sándwich” de fase sólida (Human cytokine 25-plex; Biosource International Inc., Camarillo, CA, EE.UU.) según el protocolo del fabricante. En resumen, se pipetearon perlas recubiertas con anticuerpo primario y tampón de incubación en placas de filtro de 96 pocillos. Se incubaron los patrones y las muestras en presencia de las perlas con anticuerpo primario durante 2 h a temperatura ambiente en un agitador orbital. Tras esto, se lavaron los pocillos y se añadieron anticuerpos de detección biotinilados. Tras una incubación adicional durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron los pocillos y se añadió disolución de estreptavidina-ficoeritrina a cada pocillo y se incubó durante 30 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se lavaron los pocillos concienzudamente, se añadió fluido envolvente y se leyó usando el sistema Luminex xMAP (Luminex Corporation, Austin, TX, EE.UU.).

Tabla 1 – Citocinas medidas

IL-1β	IL-5	IL-12	INF-α	IP-10
IL-1Ra	IL-6	IL-13	INF-γ	MIG
IL-2	IL-7	IL-15	GM-CSF	Eotaxina
IL-2R	IL-8	IL-17	MIP-1α	RANTES
IL-4	IL-10	TNF-α	MIP-1β	MCP-1
IL - interleucina		MCP - proteína quimiotáctica de monocitos		
INF - interferón		MIG - monocina inducida por INF-γ		
IP - proteína inducible por interferón		MIP - proteína inflamatoria de macrófagos		
TNF - factor de necrosis tumoral				
GM-CSF - factor estimulante de las colonias de granulocitos y macrófagos				
RANTES - expresada y secretada por células T normales, regulada por activación				

El sorprendente resultado del experimento era que la presencia de los gránulos de titanio tenía un profundo efecto al desactivar casi completamente la expresión de IP-10 de una manera dependiente de la dosificación.

Los gránulos de titanio no tenían efecto o simplemente efectos menores sobre las otras citocinas cuya expresión se indujo por LPS. De manera interesante, la secreción de otras quimiocinas de la misma fami-

lia (quimiocinas CXC) que IP-10, como IL-8, no se vio afectada del mismo modo que IP-10 tras el tratamiento con gránulos de titanio. Además, quimiocinas que tenían un tamaño similar a IP-10, tales como MCP-1, no se vieron afectadas.

- 5 El control negativo (solución salina) y el control positivo (LPS solo) mostraron los efectos pronosticados con niveles de citocinas normales en todas las muestras incubadas sólo con solución salina, y niveles de citocinas aumentados drásticamente en muestras incubadas con LPS, imitando el comienzo de una respuesta inflamatoria infecciosa aguda. En muestras incubadas con gránulos de titanio en ausencia de LPS, los niveles de citocinas estaban dentro del intervalo observado para el control negativo, lo que indica que los gránulos de titanio no provocaban por sí mismos una respuesta inflamatoria.

Efecto de gránulos de Ti sobre la secreción de IP-10 en sangre humana completa

15 Se usó el modelo de sangre humana completa *ex vivo* previamente descrito anteriormente y en [55]. En resumen, se añadió sangre venosa reciente de voluntarios sanos (n=7) a diferentes cantidades de gránulos de titanio grises (GG) y se realizaron adiciones conocidas de LPS (10 ng/ml). Tras 3, 6 y 24 h, se aisló el plasma y se analizó para detectar IP-10 mediante el ensayo Luminex. En otro conjunto de experimentos, se le administró a la sangre, o bien antes o bien después del tratamiento, gránulos de titanio 1 h antes de LPS, al mismo tiempo que LPS o 1 h después de LPS.

20 Tal como se muestra en la figura 1, los gránulos de titanio grises redujeron la producción de IP-10 en sangre humana completa de voluntarios sanos, estimulados mediante LPS, de una manera dependiente de la dosis. Los resultados son significativos en todas las dosis y puntos de tiempo sometidos a prueba. Se muestran valores medios \pm EEM de 7 donantes, * indica diferencias significativas frente a LPS solo (p<0,05).

25 Con el fin de averiguar si los gránulos de titanio grises eran más eficaces como pretratamiento o postratamiento, se administraron gránulos de titanio 1 h antes de la estimulación con LPS (-1t), al mismo tiempo que LPS (0t) o 1 h tras la estimulación con LPS (+1t) (n=3). Seis horas tras la adición de LPS, se obtuvo plasma y se analizaron los niveles de IP-10 mediante el ensayo Luminex.

30 La figura 2 muestra que los gránulos de titanio eran igualmente eficaces reduciendo IP-10 en sangre que se trató previamente, o se trató al mismo tiempo e incluso tras LPS. Los niveles de IP-10 basales (sin LPS) estaban también significativamente reducidos en sangre tras los diferentes tiempos de incubación con gránulos de titanio (GG), en el mismo grado que muestras tratadas con LPS con gránulos de titanio (GG + LPS). Se muestran valores medios \pm EEM de 3 donantes, * indica diferencias significativas de GG frente a nivel basal o LPS solo, respectivamente (p<0,05).

Efecto de gránulos de Ti sobre la expresión génica de IP-10 tras incubación con sangre humana

40 Se dio a conocer el efecto de los gránulos de Ti sobre la secreción de IP-10 en los experimentos presentados anteriormente. Se investigó entonces si los gránulos de titanio tenían algún efecto sobre la expresión génica de IP-10.

Aislamiento de ARN

45 Se aisló el ARN total de monocitos o leucocitos totales tras la incubación de sangre completa con gránulos de titanio durante 2 h, usando el kit RNeasy mini (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU.), según el protocolo del fabricante. Con el fin de aislar monocitos, se incluyó una etapa de procesamiento previo antes de la lisis celular para separar monocitos de sangre completa, usando Dynabeads CD 14 recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD14 (Invitrogen/Dynal, Carlsbad, CA, EE.UU.). Se cuantificó el ARN total a 260 nm usando un espectrofotómetro Nanodrop (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EE.UU.).

Análisis de RT-PCR en tiempo real

55 Se transcribió de manera inversa el ARN total (0,5 μ g) aislado de monocitos o leucocitos totales a ADNc a 42°C durante 60 min. usando el kit de síntesis de ADNc iScript (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) que

contiene tanto oligo(dT) como hexámeros al azar. Se congeló cada ADNc (-20°C) en alícuotas hasta que se llevaron a cabo las reacciones PCR.

5 Se realizó la PCR en tiempo real en el instrumento iCycler (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) usando detección con SYBR Green. Se realizó la PCR en tiempo real para tres genes de mantenimiento: ARN ribosómico 18S (ARNr 18S), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y actina β , y cuatro genes diana: IP-10, IL-6, IL-10 y TNF- α . La tabla 2 enumera los cebadores usados y los parámetros de la PCR en tiempo real.

10 Tabla 2 – Cebadores y parámetros de PCR

Gen	Secuencia de cebador	SEQ ID NO:	T _m del amplicón (°C)	Tamaño del amplicón (pb)
IP-10	S 5'-GCTACAATGAAAAAGAAGGGTGA-3'	1	84,5	185
	A 5'-TAGGGAAGTGATGGGAGAGG-3'	2		
IL-6	S 5'-AGGAGACTTGCCTGGTGAAA-3'	3	84,0	196
	A 5'-GCATTTGTGGTTGGGTCAG-3'	4		
IL-10	S 5'-TTATCTTGTCTCTGGGCTTGG-3'	5	84,0	139
	A 5'-ATGAAGTGGTTGGGAATGA-3'	6		
TNF- α	S 5'-CTATCTGGGAGGGTCTTCC-3'	7	88,0	181
	A 5'-GGGGTAATAAAGGGATTGG-3'	8		
Actina β	S 5'-CTGGAACGGTGAAGGTGACA-3'	9	85,5	136
	A 5'-AAGGGACTTCTGTAACAATGCA-3'	10		
ARNr 18S	S 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	11	86,0	151
	A 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'	12		
GAPDH	S 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	13	85,0	87
	A 5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3'	14		

S Secuencia oligonucleotídica del cebador sentido

A Secuencia oligonucleotídica del cebador antisentido

15 Cada reacción contenía 5 μ l de ADNc, 0,5 μ M de los cebadores específicos sentido y antisentido, 12,5 μ l de 2X IQ™ SYBR® Green Supermix (BioRad, Hercules, CA, EE.UU.) en un volumen final de 25 μ l. El programa de amplificación consistió en una etapa de preincubación para la desnaturalización del ARNc molde (3 min., 95°C), seguido por 40 ciclos que consistían en una etapa de desnaturalización (15 s, 95°C), una etapa de hibridación (15 s, 60°C) y una etapa de extensión (30 s, 72°C). Tras cada ciclo, se midió la fluorescencia a 72°C. Se ejecutó un control negativo sin molde de ADNc en cada ensayo. Se ejecutaron las muestras por duplicado.

25 Se calcularon las eficacias en tiempo real a partir de las pendientes proporcionadas en el software del instrumento iCycler usando diluciones en serie, mostrando todos los transcritos investigados altas tasas de eficacia de PCR en tiempo real, y alta linealidad ($r > 0,99$) cuando se usaron concentraciones diferentes. Se sometieron los productos de PCR a un análisis de la curva de fusión en el instrumento iCycler y posteriormente a una electroforesis en gel de agarosa al 2%/TAE para confirmar la especificidad de la amplificación, la T_m y el tamaño del amplicón, respectivamente.

30 Con el fin de permitir la cuantificación relativa tras la PCR, se construyeron curvas patrón a partir de las reacciones patrón para cada gen diana y de mantenimiento representando gráficamente los valores de Ct (ciclo umbral), es decir, el número de ciclo en el que la señal de fluorescencia supera el fondo, frente al logaritmo de la dilución del ADNc. Se usaron entonces las lecturas de Ct para cada una de las muestras desconocidas para calcular la cantidad de o bien el gen diana o bien el gen de mantenimiento en relación con el patrón. Se calcularon los niveles de ARNm relativos como la razón de la concentración relativa para los genes diana en relación con la de la media entre los tres genes de mantenimiento (ARNr 18S, GAPDH y actina β), para corregir con respecto al ARN. Se expresaron los valores como un porcentaje de muestras control negativo (solución salina), que se fijaron a 100.

Se monitorizó la expresión génica de IP-10 en a) leucocitos totales que permanecían en suspensión tras la incubación con gránulos de titanio, b) leucocitos totales que se unieron a gránulos de titanio tras la incubación y c) monocitos aislados con perlas recubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD 14.

- 5 La figura 3 ilustra la expresión génica relativa de IP-10 en monocitos y leucocitos totales tras incubar sangre completa con gránulos de titanio durante 2 h. Se observa en la figura 3 que los monocitos tenían la expresión génica de IP-10 más alta. Los leucocitos que se habían unido a los gránulos mostraban expresión génica de IP-10 superior (12 veces) que leucocitos que permanecían en suspensión.
- 10 Se aislaron monocitos humanos para monitorizar la expresión génica de IP-10 con gránulos de titanio. Tal como se observa en la figura 4, los niveles de ARNm de IP-10 estaban regulados por disminución en monocitos tras la incubación con gránulos de titanio (2 h de incubación) y estimulados con LPS en los dos donantes sometidos a prueba.

15 Recuento de glóbulos blancos total y diferencial

Se realizaron experimentos con el fin de averiguar qué tipos de leucocitos tenían la capacidad para unirse a la superficie de gránulos de titanio tras incubar con sangre humana completa.

- 20 Tras incubar sangre con gránulos de titanio grises durante 2 h, tal como se describió anteriormente, se realizaron inmediatamente recuentos de glóbulos blancos (WBC) totales y diferenciales en un analizador de hematología (Cell-Dyn 4000, Abbott Diagnostics Division, Santa Clara, CA, EE.UU.).

25 La figura 5 ilustra el recuento de WBC total y diferencial (es decir, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos, respectivamente) tras 2 h de incubación con y sin gránulos de titanio grises (GG). Los gránulos de titanio mostraban la capacidad de unirse a neutrófilos y monocitos, que se sabe que son productores de IP-10.

30 La tabla 3 a continuación enumera el intervalo normal para el recuento de WBC y los glóbulos blancos diferenciales.

Tabla 3 – Intervalo normal del recuento de WBC y WBC diferenciales

	Número de células por l	Porcentaje de WBC totales
Recuento de WBC	4,5-11x10 ⁹	
Neutrófilos polimorfonucleares	1,8-7,8x10 ⁹	50-70%
Neutrófilos en banda	0-0,7x10 ⁹	0-10%
Basófilos	0-0,2x10 ⁹	0-2%
Eosinófilos	0-0,45x10 ⁹	0-6%
Linfocitos	1-4,8x10 ⁹	15-45%
Monocitos	0-0,8x10 ⁹	0-10%

Estadística

- 35 Todos los datos se presentan como valores medios ± EEM. Se evaluaron las diferencias entre grupos mediante la prueba de la t de Student usando el programa SPSS® para Windows, versión 14.0. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos al nivel de P<0,05.

Capacidad de unión a IP-10 de Ti

40

Materiales

- 45 Se adquirió IP-10 humana recombinante de R&D Systems y se analizó IP-10 usando la técnica de ELISA de tipo “sándwich” según el fabricante (R&D Systems). Se estudió el efecto de diferentes formas de titanio sobre el nivel de quimiocinas en tres sistemas diferentes: un modelo de bucle de sangre, suero/PBS con adiciones conocidas de IP-10 y en líquido sinovial. La tabla 4 enumera las formas de titanio sometidas a prueba.

Tabla 4 – Formas de Ti investigadas

Metal	Abreviatura	Composición	Tamaño de partícula	Fabricante
Gránulos de Ti	GG	99,97%, >80% forma de esponja	∅ ~ 1 mm	Hereford Metal Powder Co Ltd
Gránulos de Ti tratados con calor (900°C, 3 h)	WG	99,97%	∅ ~ 1 mm	Hereford Metal Powder Co Ltd
GG tamizados	GP	99,97%, >80% forma de esponja	< 0,075 mm	Hereford Metal Powder Co Ltd
WG molidos	WP	99,97%	*	Hereford Metal Powder Co Ltd

* Las partículas de Ti resultantes tenían generalmente un tamaño en el intervalo de submicrómetros hasta 100 µm pero con un tamaño de diámetro promedio de aproximadamente 10 µm

5

Sistema de bucle de sangre

Se estudió IP-10 en un sistema de bucle de sangre (descrito anteriormente [56, 57]), con la excepción de que se usó sangre completamente heparinizada (20 U/ml, Leo Pharma). En resumen, se recogió sangre humana reciente de voluntarios sanos en jeringuillas de 60 ml con la superficie heparinizada con una cánula (calibre 18, Microlance; Becton Dickinson) que se conectó a tubos de silicona con la superficie heparinizada. Durante la toma de muestras, se hizo rotar de manera continua la jeringuilla. Se añadió entonces sangre (7-8 ml) a cada bucle (tubo de PVC, diámetro de 6,3 mm, longitud de 39 cm) dejando un volumen de aire de ~4 ml. Tras llenarse los tubos, se cerraron los bucles con un conector de acero inoxidable heparinizado y se colocaron en un dispositivo oscilante 37°C. Se hicieron oscilar los bucles a un parámetro de amplitud que impedía que la sangre entrase en contacto con los conectores. Para iniciar la producción de IP-10, se añadió LPS de *Escherichia coli* (10 ng/ml, Sigma). Se añadió titanio en diferentes cantidades y diferentes formas a los bucles para investigar el efecto sobre los niveles de IP-10. Tras 10, 30, 60, 120 y 180 minutos, se recogieron muestras y se almacenó el plasma a -20°C hasta el análisis de IP-10.

20

Suero/PBS con adiciones conocidas

Se preparó suero a partir de sangre donada según el protocolo de laboratorio convencional. Se complementó PBS con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% para impedir la unión de la proteína al material de plástico. Se añadió IP-10 humana recombinante al suero /PBS (200-2000 pg/ml) y se incubaron muestras (500 µl) con diferentes metales/óxidos (20-200 mg) durante 3 horas a temperatura ambiente en un agitador orbital (~400 rpm). Tras la incubación, se centrifugaron las muestras brevemente (2 minutos a 10.000 g) y se analizaron inmediatamente los sobrenadantes para determinar el contenido en IP-10 o se almacenaron congelados (-20°C) hasta el análisis.

25

Líquido sinovial

Se obtuvo líquido sinovial (LS) de pacientes con artritis reumatoide en el Karolinska Hospital (Solna, Suecia) o del Oslo Rikshospital (Noruega). Durante 3 horas, se incubaron 150 µl de LS a temperatura ambiente en un agitador orbital (~400 rpm) con o sin (10-40 mg/muestra) gránulos blancos molidos (WP). Cuando se estudió el efecto de diferentes metales/óxidos, se usaron 500 µl de muestra y 20 mg de metal/óxidos. Tras la incubación, se centrifugaron las muestras brevemente (2 minutos a 10.000 g) y se analizaron inmediatamente los sobrenadantes para determinar el contenido en IP-10 o se almacenaron congelados (-20°C) hasta el análisis.

35

40

Se estimuló la infección de la sangre mediante la adición de LPS a bucles de sangre, lo que dio como resultado un aumento en la producción de IP-10. Tras 2 horas, el nivel de IP-10 en la sangre tratada con LPS estaba elevado y se elevó adicionalmente tras 3 horas. Añadiendo gránulos de titanio (GG) en forma de esponja no tratados, se redujeron los niveles de IP-10 en la sangre infectada, véase la figura 6. Hubo una reacción de tipo dosis-respuesta cuando se añadieron diferentes cantidades de GG. Se observaron niveles de IP-10 normales en sangre no infectada tras la adición de GG solo. Los dos controles negativos, PBS o PBS con 200 mg de gránulos de titanio, no mostraron aumento en los niveles de IP-10.

Se analizó el efecto de diferentes formas de gránulos de titanio sobre los niveles de IP-10 en el sistema de bucle de sangre. En sangre completa, se encontró que gránulos tanto grises (GG) como blancos (WG) eran igualmente eficaces en la reducción de IP-10. Las formas de polvo de los gránulos, GP y WP, eran más eficaces que los gránulos completos y el polvo blanco (WP) tenía la capacidad de reducción de IP-10 más alta tal como se ilustra en la figura 7. Esta figura ilustra los niveles de IP-10 en sangre 180 minutos tras la adición de LPS. La adición de 200 mg de polvo blanco (WP) a 7 ml de sangre infectada dio como resultado una respuesta de IP-10 totalmente suprimida. Se usó sangre tratada con PBS como control negativo.

Con el fin de evaluar la capacidad de reducción de IP-10 de gránulos de titanio blancos molidos, se añadieron diferentes cantidades de polvo blanco (WP) a sangre infectada (tratada con LPS) y se analizaron los niveles de IP-10 180 minutos tras la adición. Se encontró que IP-10 se regulaba en la sangre de un modo de tipo dosis-respuesta cuando se añadía WP, lo que se ilustra en la figura 8. La adición de 66 mg de polvo blanco a 7 ml de sangre infectada dio como resultado un nivel de IP-10 normalizado.

Se estudió la unión temporal de IP-10 a polvo blanco en disolución de PBS y ya tras 10 minutos WP pudo reducir los niveles de IP-10 hasta cero (3 pg de IP-10/mg de WP). La reducción no era reversible y se sostuvo durante tanto tiempo como se estudió (24 horas). No era posible bloquear esta unión con BSA al 5% o suero bovino fetal al 10% y no se redujo tras la adición de detergente (Tween-20 al 0,05%).

Se ha mostrado previamente que el líquido sinovial de articulaciones inflamadas en pacientes con artritis reumatoide contiene altos niveles de IP-10, lo que puede influir en la patogénesis de la enfermedad [20, 58]. El nivel de IP-10 en líquido sinovial de cinco pacientes diferentes se redujo fuertemente tras la adición de polvo de gránulos blancos (WP), véase la figura 9. Se incubó el líquido sinovial con o bien 10 o bien 40 mg de WP durante 3 horas a temperatura ambiente.

Se estudió la capacidad de unión a IP-10 de gránulos blancos molidos en líquido sinovial en un sistema en el que se añadieron cantidades crecientes de WP al LS, véase la figura 10. Se observó una relación de dosis-respuesta aparente en estos estudios.

Se calculó la capacidad de reducción de IP-10 de gránulos blancos molidos (WP) para los diferentes sistemas estudiados en el presente documento. En PBS con adiciones conocidas, se retuvieron >2000 pg de IP-10/mg de WP, en suero con adiciones conocidas, se retuvieron aproximadamente 50 pg de IP-10/mg de WP y en líquido sinovial se retuvieron >3,5 pg de IP-10/mg de WP.

Caracterización física de gránulos de Ti

Microscopio electrónico de barrido

Se usó un microscopio electrónico de barrido (MEB, Philips XL 30 ESEM, FEI Electron Optics, Eindhoven, Países Bajos) para examinar la superficie de gránulos de titanio grises (GG) y blancos (WG).

Porosimetría por intrusión de mercurio

Se realizaron mediciones de la distribución del tamaño de poro de los gránulos de titanio grises (GG) y blancos (WG) usando porosimetría de mercurio (Autopore IV 9500, Micromeritics, Norcross, GA, EE.UU.). El ángulo de contacto usado era de 130°. Se evacuaron las muestras durante 10 min. a una presión de evacuación de aproximadamente 50 µmHg. La presión de llenado de mercurio era de aproximadamente 0,22 psia.

La figura 11 muestra la superficie de gránulos de titanio no tratados (gránulos grises, GG), véase A, C y E, y gránulos de titanio (gránulos blancos, WG) tratados con calor (900°C, 3 h), véase B, D y E, a aumentos de 250x, 2000x y 5000x. Se observa a partir de las micrografías que el tratamiento térmico redujo el número de poros en los gránulos blancos. Esto concuerda con los resultados obtenidos con la porosidad total, que era del 73% y el 57% para gránulos de titanio grises y blancos, respectivamente. Se proporcionan en la tabla 5 el volumen de intrusión total, el área superficial total, la mediana del diámetro de poro, la densidad en masa, la densidad aparente y el porcentaje de porosidad para gránulos de titanio grises y blancos.

10 Tabla 5 – Resumen de datos de intrusión para gránulos de Ti grises y blancos

Propiedad	Gránulos de Ti grises	Gránulos de Ti blancos
Volumen de intrusión total (ml/g)	0,7394	0,4895
Área superficial total (m ² /g)	0,055	0,021
Mediana del diámetro de poro (volumen) (µm)	180,0	328,7
Mediana del diámetro de poro (área) (µm)	21,0	28,9
Diámetro de poro promedio (4V/A) (µm)	53,7	93,3
Densidad en masa a 0,22 psia (g/ml)	0,9913	1,1614
Densidad aparente (esquelética) (g/ml)	3,7126	2,6916
Porosidad (%)	73,3	56,9

La figura 12 ilustra el logaritmo del volumen de intrusión de mercurio diferencial frente al tamaño de poro para gránulos de Ti grises (A) y blancos (B). Tal como se muestra en la figura, los microporos (~ 40 µm) presentes en los gránulos grises estaban ausentes en los gránulos blancos, mientras que los macroporos (~ 400 µm) no se vieron afectados por el tratamiento térmico.

Capacidad de unión a IP-10 de Ti y otros metales

20 Materiales

Con el fin de investigar la capacidad de unión a IP-10 de diferentes óxidos de titanio y otros metales, se usaron dos sistemas diferentes: suero con adiciones conocidas de IP-10 y en líquido sinovial. La tabla 6 enumera los otros metales y óxidos que se estudiaron además de las formas de titanio enumeradas en la tabla 6.

25 Tabla 6 – Metales investigados

Metal	Abreviatura	Composición	Tamaño de partícula	Fabricante
TiO ₂ (80% de anatasa/20% de rutilo)	TiO ₂ (80A/20R)	99,5%	~ 21 nm	Degussa
Óxido de Ti (IV) (rutilo)	Ti(IV)Ox(R)	99,9%	<5 µm	Aldrich
TiO ₂ (anatasa)	TiO ₂ (A)	-	-	Sachtleben
Carburo de titanio	TiCarb	-	<2 µm	Roth
Óxido de Ti (II)	Ti(II)Ox	99,9%	<45 µm	Aldrich
Polvo de Ti	Ti ~325	99,9%	<45 µm	Aldrich
Polvo de Ta	Ta ~325	99,9%	<45 µm	Aldrich
Polvo de V	V ~325	99,5%	<45 µm	Aldrich
Óxido de Mn (II, III)	Mn(II, III)Ox	97%	-	Aldrich
Óxido de Ni (II)	Ni(II)Ox	76-77%	< 10 µm	Aldrich
Óxido de Cu (II)	Cu(II)Ox	97%	< 5 µm	Aldrich
Óxido de Fe (III)	Fe(III)Ox	98%	< 5 µm	Aldrich
Óxido de Zn	ZnOx	99%	-	Fluka

Se añadieron 20 mg de los diferentes metales a suero con adiciones conocidas (200 pg/ml) de IP-10. La figura 13 muestra los resultados de estos experimentos. Entre las diferentes formas de titanio, puede concluirse que el titanio blanco (WP, Ti(IV)Ox(R), TiO₂(80A/20R), TiO₂(A)) es la forma más eficaz para disminuir los niveles de IP-10 en sangre. Tanto tantalio como vanadio, que están estrechamente relacionados con el titanio, eran eficaces en la disminución de IP-10. Ni el zinc, ni el cobre ni el manganeso afectaban a los niveles de IP-10 en suero con adiciones conocidas en ningún grado.

Se investigó también el efecto de estos diferentes óxidos y metales sobre los niveles de IP-10 en líquido sinovial, véase la figura 14. Estos resultados confirmaron en general los resultados del suero con adiciones conocidas de IP-10 con algunas excepciones. En LS, Ti(II)oxid (negro) y zinc eran más eficaces que lo observado en estudios en suero, mientras que los otros metales afectaban a los niveles de IP-10 en el mismo grado.

Un experto en la técnica entenderá que pueden hacerse diversas modificaciones y cambios en la presente invención sin apartarse del alcance de la misma, que se define mediante las reivindicaciones adjuntas

Bibliografía

[1] Refai *et al.*, "Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines", Journal of Biomedical Materials Research parte A, 2004, 70(2): 194-205

[2] Fritz *et al.*, "Chemokine gene activation in human bone marrow-derived osteoblasts following exposure to particulate wear debris", Journal of Biomedical Materials Research parte A, 2006, 77(1): 192-201

[3] Rader *et al.*, "Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles", The Journal of Arthroplasty, 1999, 14(7): 840-848

[4] Thomsen y Gretzer, "Macrophage interactions with modified material surfaces", Current Opinion in Solid State and Materials Science, 2001, 5: 163-176

[5] Soejima y Rollins, "A functional IFN-gamma-inducible protein-10/CXCL10-specific receptor expressed by epithelial and endothelial cells that is neither CXCR3 nor glycosaminoglycan", The Journal of Immunology, 2001, 167(11): 6576-6582

[6] Wang *et al.*, "High levels of CXCL10 are produced by intestinal epithelial cells in AIDS patients with active cryptosporidiosis but not after reconstitution of immunity", Infection and Immunity, 2007, 75(1): 481-487

[7] Lane *et al.*, "The C-X-C chemokine IP-10 stimulates HIV-1 replication", Virology, 2003, 307(1): 122-134

[8] Reinhart, "Chemokine induction by HIV-1: recruitment to the cause", Trends in Immunology, 2003, 24(7): 351-353

[9] Cinque *et al.*, "Cerebrospinal fluid interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10, CXCL10) in HIV-1 infection", Journal of Neuroimmunology, 2005, 168(1-2): 154-163

[10] ter Meulen *et al.*, "Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever", The Journal of Infectious Diseases, 2004, 190(10): 1821-1827

[11] Spurrell *et al.*, "Human airway epithelial cells produce IP-10 (CXCL10) in vitro and in vivo upon rhinovirus infection", American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology, 2005, 289(1): L85-95

[12] Sorensen, "Targeting the chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in the central nervous system: potential therapy for inflammatory demyelinating disease?", Current Neurovascular Research, 2004, 1(2): 183-190

- [13] Simpson *et al.*, "Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions", *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2000, 26(2): 133-142
- 5 [14] Sorensen *et al.*, "Multiple sclerosis: a study of CXCL10 and CXCR3 co-localization in the inflamed central nervous system", *Journal of Neuroimmunology*, 2002, 127(1-2): 59-68
- [15] Tanuma *et al.*, "Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis", *Acta Neuropathologica*
10 (Berlín), 2006, 112(2): 195-204
- [16] Mahad *et al.*, "Expression of chemokines in the CSF and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis", *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 2002, 72(4): 498-502
- 15 [17] Tsunoda *et al.*, "Distinct roles for IP-10/CXCL10 in three animal models, Theiler's virus infection, EAE, and MHV infection, for multiple sclerosis: implication of differing roles for IP-10", *Multiple Sclerosis*, 2004, 10(1): 26-34
- 20 [18] Chen *et al.*, "In vivo administration of plasmid DNA encoding recombinant immunotoxin DT390-IP-10 attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis", *Journal of Autoimmunity* 2007, 28(1): 30-40
- [19] Patel *et al.*, "CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium", *Clinical Immunology* 2001, 25 98(1): 39-45
- [20] Aggarwal *et al.*, "Chemokine and chemokine receptor analysis reveals elevated interferon-inducible protein-10 (IP)-10/CXCL10 levels and increased number of CCR5+ and CXCR3+ CD4 T cells in synovial fluid of patients with enthesitis-related arthritis (ERA)", *Clinical and Experimental Immunology* 2007, 30 148(3): 515-519
- [21] Hanaoka *et al.*, "A novel mechanism for the regulation of IFN-gamma inducible protein-10 expression in rheumatoid arthritis", *Arthritis Research & Therapy*, 2003, S(2): R74-81
- [22] Garcia-Vicuna *et al.*, "CC and CXC chemokine receptors mediate migration, proliferation, and matrix metalloproteinase production by fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients", *Arthritis & Rheumatism*, 2004, 50(12): 3866-3877
- 35 [23] Narumi *et al.*, "Expression of IFN-inducible protein-10 in chronic hepatitis", *The Journal of Immunology*, 1997, 158(11): 5536-5544
- 40 [24] Nishioji *et al.*, "Increase of chemokine interferon-inducible protein-10 (IP-10) in the serum of patients with autoimmune liver diseases and increase of its mRNA expression in hepatocytes", *Clinical and Experimental Immunology* 2001, 123(2): 271-279
- 45 [25] Flier *et al.*, "Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation", *The Journal of Pathology*, 2001, 194(4): 398-405
- [26] Narumi *et al.*, "Serum levels of IFN-inducible protein-10 relating to the activity of systemic lupus erythematosus", *Cytokine*, 2000, 12(10): 1561-1565
- 50 [27] Danese y Gasbarrini, "Chemokines in inflammatory bowel disease", *Journal of Clinical Pathology*, 2005, 58 (10): 1025-1027
- [28] Ito *et al.*, "Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice", *Clinical and Experimental Immunology*, 2006, 146(2): 330-338
- 55 [29] Ugucioni *et al.*, "Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis", *The American Journal of Pathology*, 1999, 155(2): 331-336

- [30] Singh *et al.*, "IFN-gamma-inducible chemokines enhance adaptive immunity and colitis" *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2003, 23(10): 591-600
- 5 [31] Singh *et al.*, "CXCR3 axis: role in inflammatory bowel disease and its therapeutic implication", *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 2007, 7(2): 111-123
- [32] Sasaki *et al.*, "Blockade of CXCL10 protects mice from acute colitis and enhances crypt cell survival", *European Journal of Immunology*, 2002, 32(11): 3197-3205
- 10 [33] Suzuki *et al.*, "Blockade of interferon-gamma-inducible protein-10 attenuates chronic experimental colitis by blocking cellular trafficking and protecting intestinal epithelial cells", *Pathology International*, 2007, 57(7): 413-420
- [34] Inatomi *et al.*, "Butyrate blocks interferon-gamma-inducible protein-10 release in human intestinal subepithelial myofibroblasts", *Journal of Gastroenterology*, 2005, 40(5): 483-489
- 15 [35] Breuer *et al.*, "Rectal irrigation with short-chain fatty acids for distal ulcerative colitis. Preliminary report," *Digestive Diseases and Science*, 1991, 36(2): 185-187
- 20 [36] Herder *et al.*, "Constitutive and regulated expression and secretion of interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10/CXCL10) in human adipocytes", *International Journal of Obesity (Lond)*, 2007, 31(3): 403-410
- [37] Mach *et al.*, "Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells", *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, 104(8): 1041-1050
- 25 [38] Heller *et al.*, "Chemokine CXCL10 promotes atherogenesis by modulating the local balance of effector and regulatory T cells", *Circulation*, 2006, 113(19): 2301-2312
- [39] Braunersreuther *et al.*, "The specific role of chemokines in atherosclerosis", *Thrombosis and Haemostasis*, 2007, 97(5): 714-721
- 30 [40] Bisset and Schmid-Grendelmeier, "Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective," *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2005, 11(1): 35-42
- 35 [41] Medoff *et al.*, "IFN-gamma-inducible protein 10 (CXCL10) contributes to airway hyperreactivity and airway inflammation in a mouse model of asthma", *The Journal of Immunology*, 2002, 168(10): 5278-5286
- 40 [42] Larsson, "Aspects on pathophysiological mechanism in COPD", *Journal of Internal Medicine*, 2007, 262: 311-340
- [43] Hu *et al.*, "Elevation of CXCR3-binding chemokines in urine indicates acute renal-allograft dysfunction", *American Journal of Transplantation*, 2004, 4(3): 432-437
- 45 [44] Kanmaz *et al.*, "Surveillance of acute rejection in baboon renal transplantation by elevation of interferon-gamma inducible protein-10 and monokine induced by interferon-gamma in urine", *Transplantation*, 2004, 78(7): 1002-1007
- 50 [45] Zhu *et al.*, "Changes of inducible protein-10 and regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted protein in acute rejection of pancreas transplantation in rats", *World Journal of Gastroenterology*, 2006, 12(26): 4156-4160
- [46] Melter *et al.*, "Expression of the chemokine receptor CXCR3 and its ligand IP-10 during human cardiac allograft rejection", *Circulation*, 2001, 104(21): 2558-2564
- 55 [47] Baker *et al.*, "Genetic deletion of chemokine receptor CXCR3 or antibody blockade of its ligand IP-10 modulates posttransplantation graft-site lymphocytic infiltrates and prolongs functional graft survival in pancreatic islet allograft recipients", *Surgery*, 2003 134(2): 126-133

- [48] Hancock *et al.*, "Donor-derived IP-10 initiates development of acute allograft rejection", *The Journal of Experimental Medicine*, 2001, 193(8): 975-980
- 5 [49] Hancock *et al.*, "Requirement of the chemokine receptor CXCR3 for acute allograft rejection", *The Journal of Experimental Medicine*, 2000, 192(10): 1515-1520
- [50] Ondeykal *et al.*, "Discovery of structurally diverse natural product antagonists of chemokine receptor CXCR3", *Molecular Diversity*, 2005, 9(1-3): 123-129
- 10 [51] Coussens y Werb, "Inflammation and cancer", *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867
- [52] van Kempen *et al.*, "The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution", *European Journal of Cell Biology*, 2003, 82(11): 539-548
- 15 [53] Robinson *et al.*, "Soluble mediators of inflammation during tumor development", *Advances in Cancer Research*, 2005, 93: 159-187
- [54] Gouwym *et al.*, "Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response", *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2005, 16(6): 561-580
- 20 [55] Wang *et al.*, "Cytokine modulation in experimental endotoxemia: characterization of an ex vivo whole blood model", *European Surgical Research*, 2000, 32(2): 65-73
- 25 [56] Bennet *et al.*, "Incompatibility between human blood and isolated islets of Langerhans: a finding with implications for clinical intraportal islet transplantation?", *Diabetes*, 1999, 48(10): 1907-1914
- [57] Gong *et al.*, "Tubing loops as a model for cardiopulmonary bypass circuits: both the biomaterial and the blood-gas phase interface induce complement activation in an in vitro model", *Journal of Clinical Immunology*, 1996, 16 (4): 222-229
- 30 [58] Patel *et al.*, "CXCR3 and CCR5 ligands in rheumatoid arthritis synovium", *Clinical Immunology* 2001, 98(1): 39-45
- 35 [59] Documento WO 2005/060457

REIVINDICACIONES

1. Uso de un metal o un óxido de un metal en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una respuesta inflamatoria adversa **caracterizada por** expresión adversa y/o liberación de proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, en un sujeto, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inflamatoria adversa es una enfermedad autoinmunitaria.
3. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inflamatoria adversa es una enfermedad inflamatoria del tubo digestivo de dicho sujeto.
4. Uso según la reivindicación 1, en el que dicha respuesta inflamatoria adversa es una enfermedad cutánea inflamatoria.
5. Uso de un metal o un óxido de un metal en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad infecciosa **caracterizada por** expresión adversa y/o liberación de proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, en un sujeto, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.
6. Uso de un metal o un óxido de un metal en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad de injerto contra huésped **caracterizada por** expresión adversa y/o liberación de proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, en un sujeto, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.
7. Uso de un metal o un óxido de un metal en la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una reacción de cuerpo extraño **caracterizada por** expresión adversa y/o liberación de proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, en un sujeto, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.
8. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho metal se selecciona de un grupo de titanio o tantalio y dicho óxido de dicho metal se selecciona de un grupo de un óxido de titanio o un óxido de tantalio.
9. Uso según la reivindicación 8, en el que dicho óxido de titanio es un dióxido de titanio, preferiblemente un dióxido de titanio de forma rutilo o una mezcla de las formas rutilo y anatasa.
10. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que dicho metal o dicho óxido de metal está en forma de gránulos o partículas que tienen una porosidad total de al menos aproximadamente el 50%.
11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que dicho metal o dicho óxido de metal está en forma de gránulos o partículas que tienen un área superficial total de al menos aproximadamente 0,01 m²/g.
12. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho metal o dicho óxido de metal está en forma de partículas de metal u óxido de metal que tienen un diámetro promedio de partícula de polvo inferior a 100 μ m.
13. Método de eliminación de la proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, de una muestra corporal *in vitro*, que comprende poner en contacto dicha muestra corporal con un metal o un óxido de un metal, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio.

14. Método según la reivindicación 13, en el que dicha muestra corporal es un fluido corporal seleccionado de un grupo de sangre, plasma sanguíneo, líquido linfático, líquido cefalorraquídeo, ascitis o líquido sinovial.

5 15. Disposición (10) de purificación de un fluido corporal en forma de una jeringuilla que comprende:

10 - una cámara de purificación que tiene una entrada y salida de fluido común y que comprende partículas (1) compuestas por un metal o un óxido de un metal, en la que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio; y

15 - un filtro (12) dispuesto en conexión con dicha entrada y salida de fluido común para impedir que dichas partículas (1) salgan de dicha cámara de purificación, en la que dichas partículas (1) están dispuestas para purificar un fluido corporal que pasa a través de dicha cámara de purificación de la proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10.

20 16. Uso de una disposición (10, 20) de purificación de un fluido corporal que comprende una cámara de purificación que tiene una entrada de fluido y una salida de fluido y que comprende partículas (1) compuestas por un metal o un óxido de un metal, en el que dicho metal es un metal del grupo 4 ó 5 de la tabla periódica de los elementos seleccionado del grupo que consiste en titanio, zirconio, hafnio, niobio y tantalio, y al menos un filtro (12; 22, 24) dispuesto en conexión con al menos una de dicha entrada de fluido y dicha salida de fluido para purificar sangre que pasa a través de dicha cámara de purificación de la proteína inducible por interferón- γ de 10 kDa, IP-10, en el que dicha sangre no pretende devolverse al mismo sujeto del que se extrajo.

25

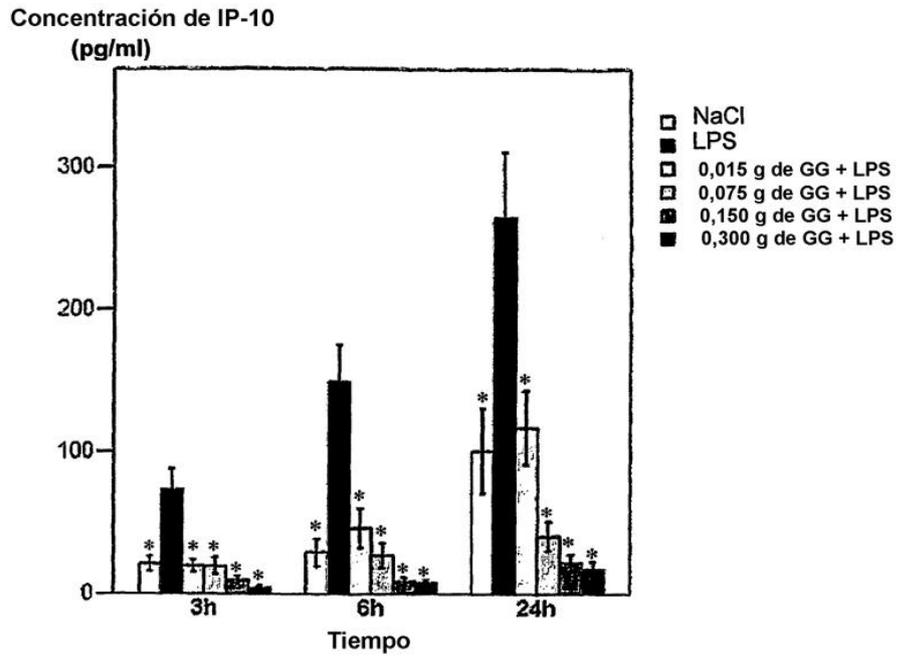


Fig. 1

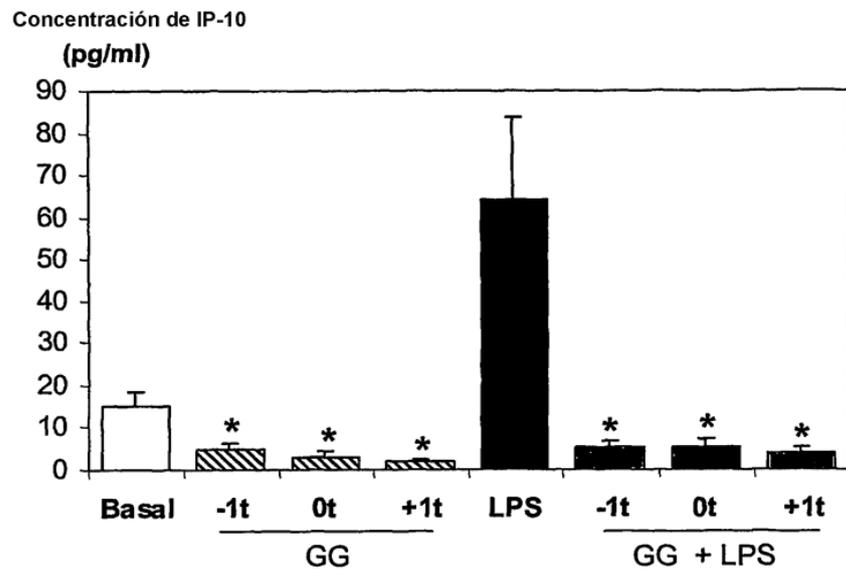


Fig. 2

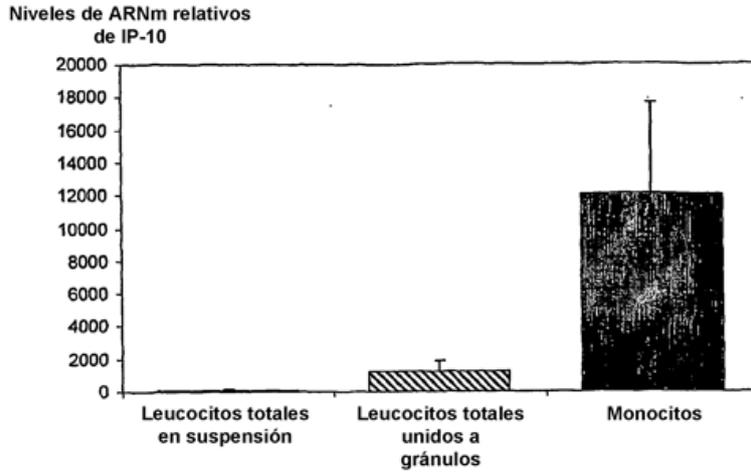


Fig. 3

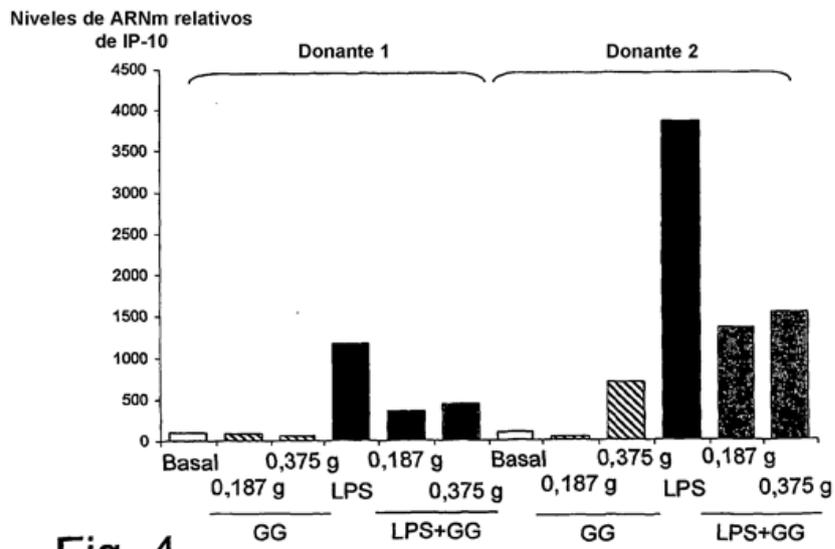


Fig. 4

Recuento de WBC ($10^9/l$)

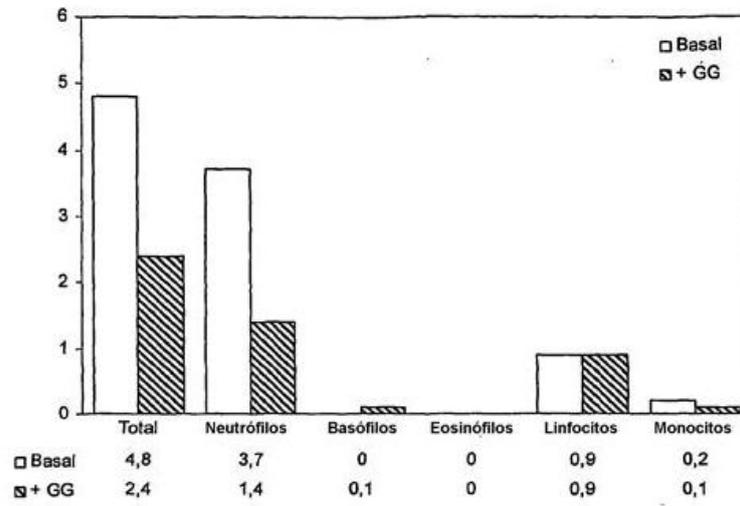


Fig. 5

Concentración de IP-10 (pg/ml)

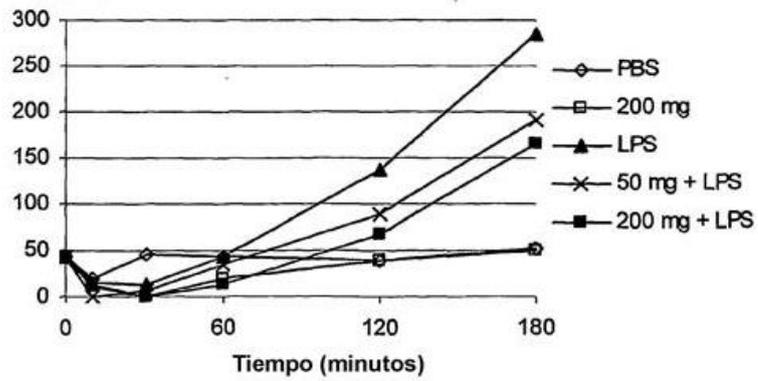


Fig. 6

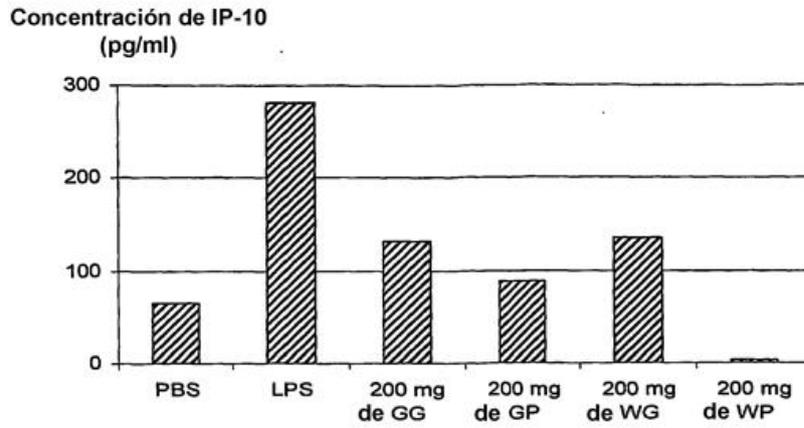


Fig. 7

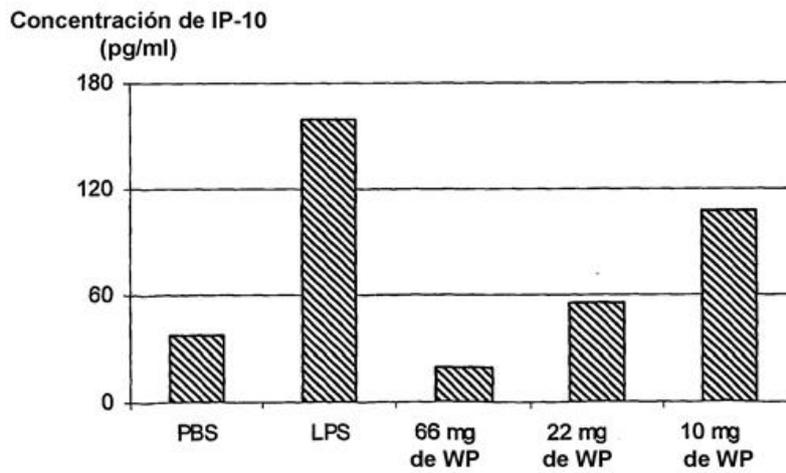


Fig. 8

Concentración de IP-10
(pg/ml)

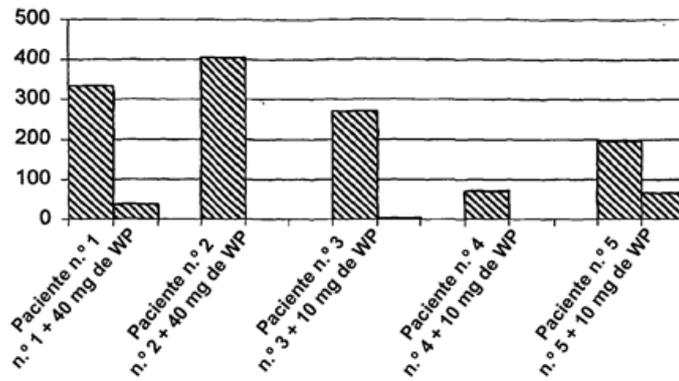


Fig. 9

Concentración de IP-10
(pg/ml)

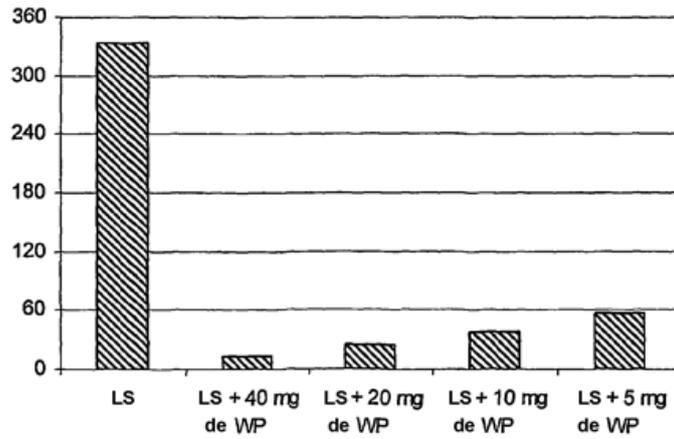


Fig. 10

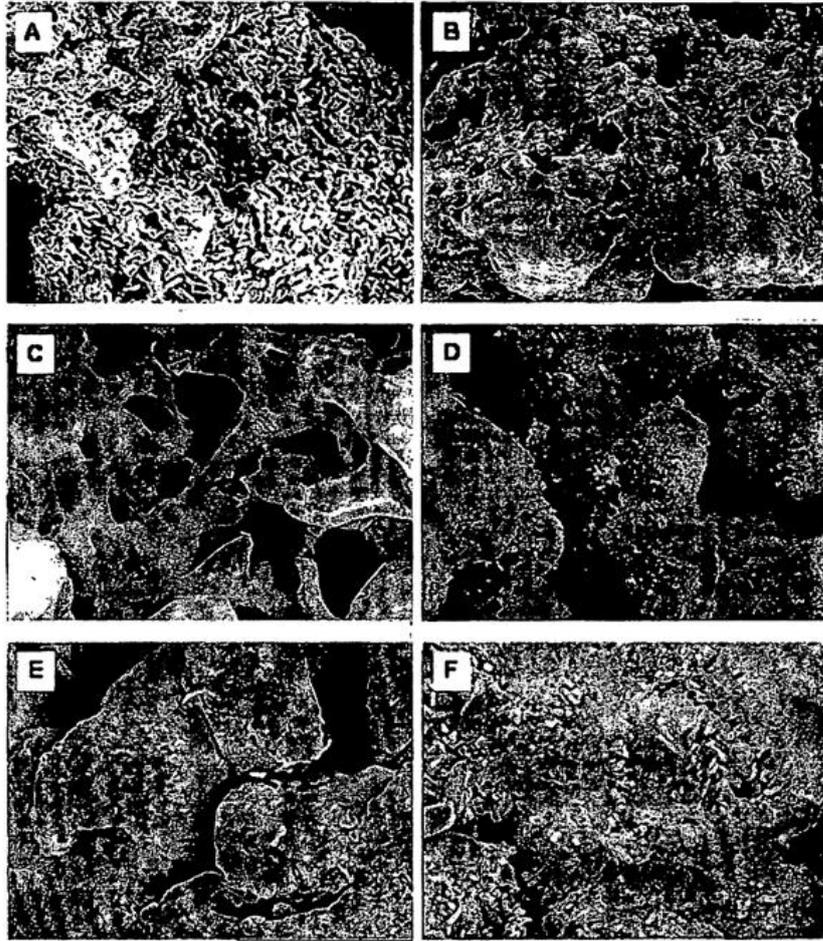


Fig. 11

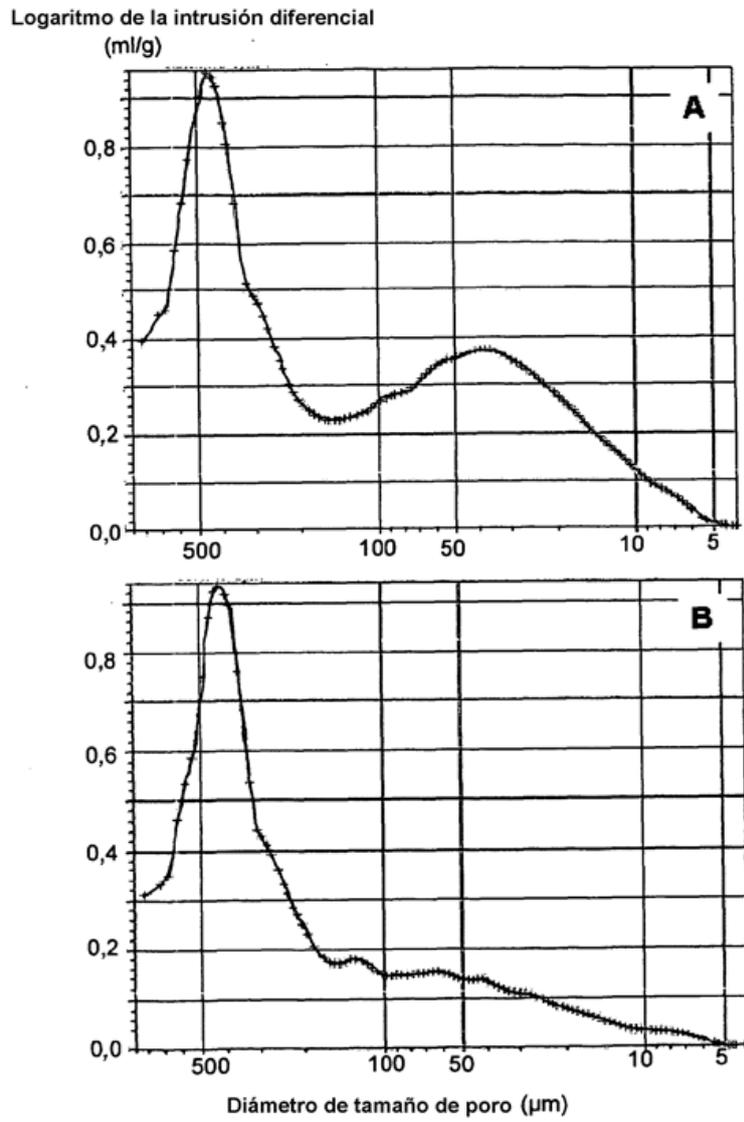


Fig. 12

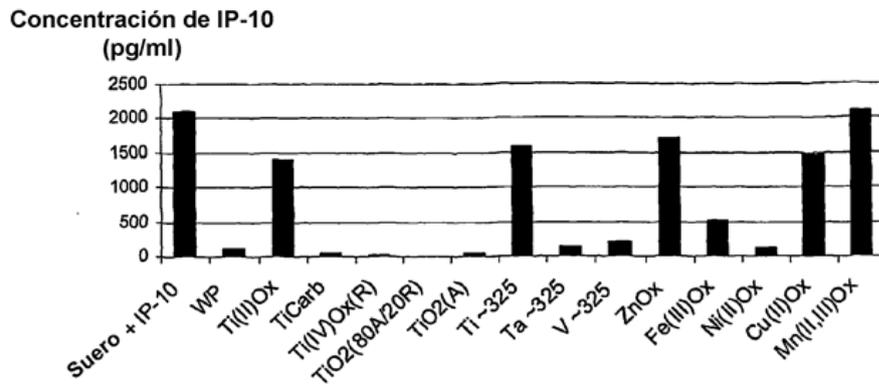


Fig. 13

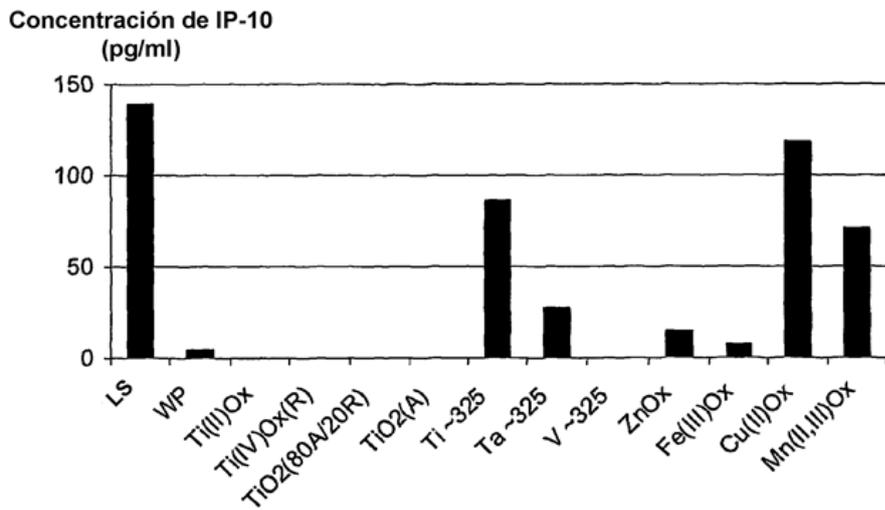


Fig. 14

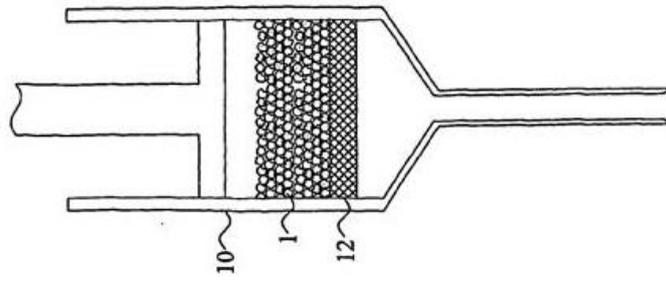


Fig. 15

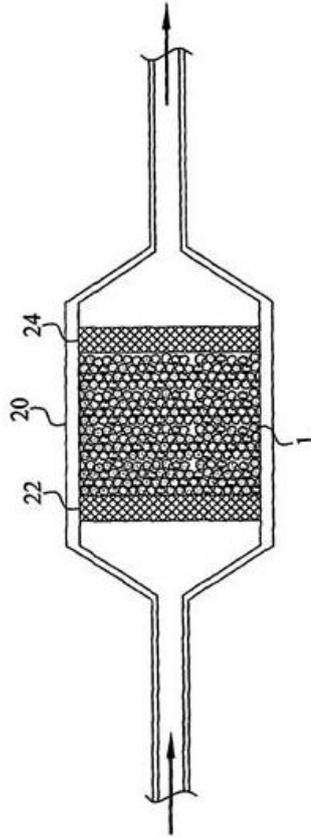


Fig. 16